

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Verena Margrit Rhiemeier  
aus Wuppertal

Tag der mündlichen Prüfung: .....

# Charakterisierung von Taps, einer neuen Aspartylprotease in der Differenzierung und Homöostase komplexer Epithelien

Gutachter: Prof. Dr. Peter Angel

PD Dr. Karin Müller-Decker

# Zusammenfassung

Die Homöostase der Epidermis basiert auf einem exakt kontrollierten Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten und ist charakterisiert durch die spezifische Expression bestimmter Keratine, Zelladhäsionsmoleküle und Proteasen. Ziel der biomedizinischen Forschung ist die Identifizierung von Proteinen, die typisch für pathologische Veränderungen der Haut sind und als Biomarker in der Diagnostik oder Therapie eingesetzt werden können.

In einem experimentellen Ansatz zur Identifizierung von Genen, deren Expression in der Rückenhaut der Maus durch den Tumorpromotor TPA und somit in entzündlicher und hyperplastischer Haut stark induziert wird, wurde eine neue Aspartylprotease (Taps = *TPA-inducible aspartic proteinase-like gene in skin*) entdeckt. In einer detaillierten Analyse von Mausgeweben konnte nachgewiesen werden, dass Taps ausschließlich in Epithelzellen exprimiert wird und dass die Expression mit der terminalen Differenzierung von mehrschichtigen Epithelien und Drüsenzellen korreliert. Die Regulation der Taps-Expression ist komplex und erfolgt auf der Ebene der TPA-induzierten Transkription über die AP-1-Untereinheiten c-Fos und JunB, der Proteinsynthese durch alternative Translationsstartstellen und posttranslational durch Autoproteolyse.

Die Epidermis von Taps-überexprimierenden, transgenen Mäusen entwickelt nach chronischer TPA-Behandlung der Rückenhaut ein deutlich verdicktes *Stratum granulosum*. Dieser Hypergranulose-Phänotyp ist zellautonom für Keratinozyten und wird möglicherweise durch den Einfluss von Taps auf Zelladhäsionsproteine, wie z.B. E-cadherin, vermittelt.

Die Analyse von murinen und humanen Hauttumoren sowie nicht-neoplastischen, hyperkeratotischen Hautläsionen macht deutlich, dass die Expression von Taps mit aberranter Differenzierung jedoch nicht mit neoplastischer Transformation assoziiert ist. Vielmehr zeichnen sich maligne Hauttumore durch die Abwesenheit von Taps-exprimierenden Zellen aus. Somit stellt Taps einen neuen potentiellen Biomarker für die klinische Differentialdiagnose pathologischer Veränderungen der Haut dar.

# Summary

The homeostasis of the epidermis is based on the tightly controlled balance between proliferation and differentiation of keratinocytes and is characterized by the specific expression pattern of certain keratins, adhesion molecules and proteases. A major aim of today's biomedical research is the identification of proteins typical for pathological changes in the skin that might be used for diagnostic or therapeutic purposes.

A novel aspartic protease (Taps = *TPA-inducible aspartic proteinase-like gene in skin*) has been discovered in an experimental approach to identify genes, the expression of which is strongly induced in inflamed and hyperplastic back skin of mice upon treatment with the tumor promoter TPA. In a detailed analysis of murine tissues, the expression of Taps was found to be confined to epithelial cells and to correlate with terminal differentiation of stratified epithelia and glandular cells. The regulation of Taps expression is complex and occurs on the level of TPA-induced transcription by the AP-1 family members c-Fos and JunB, on the level of protein synthesis by use of alternative translation initiation sites and posttranslationally through autoproteolysis.

After chronic TPA treatment the epidermis of Taps-overexpressing, transgenic mice develops a markedly thickened *stratum granulosum*. This hypergranulotic phenotype is cell autonomous for keratinocytes and might be based on the influence of Taps on cell adhesion molecules like E-cadherin.

The analysis of murine and human skin tumors as well as non-neoplastic, hyperkeratotic skin lesions reveals that the expression of Taps is associated with aberrant differentiation rather than neoplastic transformation. Moreover, malignant skin tumors are characterized by the absence of Taps-expressing cells. Hence, Taps represents a novel potential marker for the differential diagnosis of pathological alterations in the skin.

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit in der Abteilung „Signaltransduktion und Wachstumskontrolle“ des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg. Mein besonderer Dank gilt deshalb Herrn Prof. Dr. Peter Angel, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Gruppe zu arbeiten. Er hat mich stets bei der Durchführung meines Projektes unterstützt.

Mein Dank gilt ebenso Frau PD Dr. Karin Müller-Decker für ihre Bereitschaft, meine Arbeit als Beraterin im Rahmen des Doktorandenprogramms und als Gutachterin zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. Herbert Steinbeißer und Frau Prof. Dr. Gabriele Petersen möchte ich dafür danken, dass sie bei meiner Promotion als Prüfer fungieren.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Jochen Hess für die hervorragende Betreuung, seine unerschöpfliche Geduld und seine stete Diskussionsbereitschaft. Die Zusammenarbeit während der vergangenen drei Jahre war sehr angenehm.

Auch Frau Ingeborg Vogt gebührt Dank vor allem für ihre Unterstützung bei Zellkulturexperimenten. Ferner möchte ich an dieser Stelle Frau Sibylle Teurich, Frau Dr. Bettina Hartenstein und die Mitarbeitern der Transgeneinheit des DKFZ nennen, die mich bei der Generierung und Zucht der transgenen Mäuse sehr unterstützt haben.

Bei Herrn Dr. Gerhard Fürstenberger möchte ich mich für die Bereitstellung des murinen Tumormaterials bedanken, Frau Prof. Dr. Cornelia Mauch danke ich dafür, dass sie mir Proben humaner Hautläsionen zur Verfügung gestellt hat und Herrn Dr. Kai Breuhahn danke ich für die Bereitstellung der Gewebe-*Microarrays*.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen Kollegen der Arbeitsgruppe für die durchweg angenehme Arbeitsatmosphäre, für ihre Unterstützung mit Rat und Tat und für ihren Humor.

Schließlich danke ich meiner Mutter Ursula Proft, die mir immer ein zuverlässiger Rückhalt ist, und meinem Mann Arnd-Ragnar für seine Geduld und seine wertvolle Unterstützung.

# Abkürzungsverzeichnis

a	Adenin
Abb.	Abbildung
AIDS	erworbene Immunschwächekrankheit, <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATG	Basenfolge des Transkriptionsstarts (Startkodon)
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
c	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Zytomegalovirus
cpm	counts per minute, Aktivitätsangabe für Radioaktivität
dATP	Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-5'-Triphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthrazen

DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant-negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
ECL	Enhanced ChemoLuminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	grün fluoreszierendes Protein, <i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMSA	<i>Electromobility Shift Assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Rinderserum, <i>fetal calf serum</i>
g	Formelzeichen für die Erdbeschleunigung (in Angaben zur Zentrifugation) oder Zeichen für Gramm (in Gewichtsangaben) oder Guanin
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat Dehydrogenase
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HIV	humanes Immunschwäche-Virus
HPRT	Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
M	Mol, Abkürzung für die Stoffmenge in molaren Lösungen
mA	Milliampère
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat-Trihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
p.a.	Analyse-rein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pap	Papillom
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglycol
PEK	Plattenepithelkarzinom
pH	pondus hydrogenii (Maß für Wasserstoffionenkonzentration; pH = -log [H <sup>+</sup> ])



PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde(n)
SSH	<i>suppression subtractive hybridisation</i>
Std.	Stunde(n)
t	Thymin
Taps	<i>TPA-inducible aspartic proteinase like gene in skin</i>
Taq-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
tg	transgen
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
tRNA	Transfer-RNA
U	Enzymeinheit, <i>units</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen-Volumenverhältnis
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
wt	Wildtyp
w/v	Gewichts-Volumenverhältnis
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ g	Mikrogramm

**Aminosäuren**

A	Alanin	Ala
C	Cystein	Cys
D	Aspartat	Asp
E	Glutamat	Glu
F	Phenylalanin	Phe
G	Glycin	Gly
H	Histidin	His
I	Isoleucin	Ile
K	Lysin	Lys
L	Leucin	Leu
M	Methionin	Met
N	Asparagin	Asn
P	Prolin	Pro
Q	Glutamin	Gln
R	Arginin	Arg
S	Serin	Ser
T	Threonin	Thr
V	Valin	Val
W	Tryptophan	Trp
Y	Tyrosin	Tyr

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XV</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Haut . . . . .	1
1.1.1 Der Aufbau der menschlichen Haut . . . . .	1
1.1.2 Die Rückenhaut der Maus . . . . .	4
1.1.3 Pathologische Veränderungen der Epidermis . . . . .	5
1.2 Karzinogenese . . . . .	6
1.2.1 Mausmodelle zum Studium der Hautkarzinogenese . . . . .	8
1.3 Die Identifizierung von Taps . . . . .	11
1.4 Aspartylproteasen . . . . .	12
1.5 Fragestellungen . . . . .	14
<b>2 Materialien und Lösungen</b>	<b>16</b>
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien . . . . .	16
2.2 Chemikalien . . . . .	19
2.3 Kits . . . . .	22
2.4 Molekulargewichtsmarker . . . . .	22
2.5 Antikörper . . . . .	22
2.5.1 Primärantikörper . . . . .	22
2.5.2 Sekundärantikörper . . . . .	23

2.6	Radiochemikalien . . . . .	23
2.7	Oligonukleotide . . . . .	23
2.8	Zellkultur . . . . .	26
2.9	Eukaryontische Zelllinien . . . . .	26
2.10	Murines Tumormaterial . . . . .	27
2.10.1	TPA-behandelte Haut . . . . .	27
2.10.2	Papillome und Plattenepithelkarzinome . . . . .	28
2.11	Humanes Hautmaterial . . . . .	28
2.12	Klonierungen . . . . .	28
2.13	Bakterienstämme . . . . .	28
2.14	Enzyme, Puffer . . . . .	29
2.15	Lösungen . . . . .	29
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
3.1	Molekularbiologische DNA-Methoden . . . . .	32
3.1.1	Isolierung genomischer DNA . . . . .	32
3.1.2	Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Minipräparation) . . . . .	32
3.1.3	Plasmidpräparation im großen Maßstab (Maxipräparation mit Promega-Kit) . . . . .	33
3.1.4	Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen . . . . .	34
3.1.5	Dephosphorylierung von DNA . . . . .	34
3.1.6	Auffüllen von 5'-Überhängen . . . . .	34
3.1.7	Ligation von DNA . . . . .	35
3.1.8	Herstellung chemo-kompetenter E. coli-Bakterien . . . . .	35
3.1.9	Transformation chemo-kompetenter E. coli-Bakterien . . . . .	35
3.1.10	Klonierung des Konstruktes hTaps(D212N) . . . . .	36
3.1.11	Elektrophoretische Auftrennung von DNA . . . . .	36
3.1.12	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit Protokoll . . . . .	37
3.1.13	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA bzw. RNA . . . . .	37

3.1.14	Ethanolpräzipitation . . . . .	38
3.1.15	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure- Konzentration in Lösung . . . . .	38
3.1.16	Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .	39
3.1.17	Quantitative RT-PCR . . . . .	39
3.1.18	Sequenzierung von DNA . . . . .	40
3.2	Molekularbiologische RNA-Methoden . . . . .	40
3.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA . . . . .	40
3.2.2	Synthese von cDNA . . . . .	41
3.2.3	Elektrophorese von RNA . . . . .	42
3.2.4	Northern Blot . . . . .	43
3.3	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	44
3.3.1	Herstellung von Gesamt-Proteinextrakten . . . . .	44
3.3.2	Herstellung von Kern- und Zytoplasmaextrakten . . . . .	45
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	46
3.3.4	Ionenaffinitätschromatische Aufreinigung von Proteinen mit Talon- beads . . . . .	47
3.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	48
3.3.6	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot) . . . . .	49
3.3.7	DNA-Proteinbindungsanalyse . . . . .	50
3.4	Histologische Methoden . . . . .	51
3.4.1	Fixierung von Geweben und Einbettung in Paraffin . . . . .	51
3.4.2	Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten . . . . .	52
3.4.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung . . . . .	52
3.4.4	Immunhistochemie (IHC) . . . . .	53
3.4.5	Indirekte Immunfluoreszenz . . . . .	54
3.4.6	Phalloidin-Färbung . . . . .	56
3.5	Zellkulturmethoden . . . . .	56

3.5.1	Kulturbedingungen . . . . .	56
3.5.2	Passagieren von Zellen . . . . .	56
3.5.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen . . . . .	57
3.5.4	Mykoplasmen-Test . . . . .	57
3.5.5	Transfektion eukaryontischer Zellen . . . . .	58
3.5.6	Etablierung stabil transfizierter Zelllinien . . . . .	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
4.1	Taps - Sequenz und Proteasedomäne . . . . .	60
4.2	Herstellung eines polyklonalen Taps-spezifischen Antikörpers . . . . .	60
4.2.1	Spezifität des Anti-Taps-Antikörpers in Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen . . . . .	63
4.3	Expression von Taps-Protein in adultem Mausgewebe . . . . .	66
4.3.1	Expression in normalem adultem Gewebe . . . . .	67
4.4	Expression von Taps-Protein nach TPA-Behandlung und in Hauttumoren .	68
4.4.1	Expression nach TPA-Behandlung . . . . .	68
4.4.2	Expression in der Mehrstufenkarzinogenese der Maushaut . . . . .	70
4.5	Taps-Expression in Keratinozyten-Zelllinien . . . . .	71
4.5.1	Expression von Taps in humanen Hauttumoren . . . . .	72
4.6	Expression von Taps-Protein in nicht-neoplastischen Hautläsionen . . . . .	76
4.7	Transkriptionelle Regulation der Taps-Expression . . . . .	76
4.8	Expression von Taps-Varianten . . . . .	82
4.9	Taps ist eine funktionelle Aspartylprotease . . . . .	84
4.10	Lokalisation von Taps-Protein in Epithelzellen . . . . .	87
4.11	Etablierung Taps-überexprimierender Mauskeratinozyten . . . . .	90
4.12	Einfluss der Taps-Expression auf zelluläre Prozesse . . . . .	90
4.13	Generierung einer Taps-transgenen Mauslinie . . . . .	93
4.13.1	Ubiquitäre Überexpression von Taps . . . . .	94

4.13.2	Etablierung einer Mauslinie mit gewebespezifischer Taps-Überexpression . . . . .	98
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>106</b>
5.1	Taps - Expression in gesundem Gewebe . . . . .	106
5.2	Transkriptionelle Regulation der Taps-Expression . . . . .	107
5.3	Taps-Expression in pathologischen Veränderungen der Haut . . . . .	108
5.3.1	Taps in der Karzinogenese der Maushaut . . . . .	108
5.3.2	Taps - ein neuer Biomarker für die maligne Progression? . . . . .	109
5.4	Taps-Überexpression bewirkt die Ausbildung einer Hypergranulose . . . . .	111
5.5	Taps - eine neue Aspartylprotease in der Differenzierung mehrschichtiger Epithelien . . . . .	112
5.5.1	Autoproteolyse und Lokalisation von Taps . . . . .	112
5.5.2	Welche Substrate vermitteln die Funktion von Taps in vivo? . . . . .	114
5.6	Ausblick . . . . .	117

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der menschlichen Haut . . . . .	3
1.2	Modell der Karzinogenese . . . . .	7
1.3	Schematische Darstellung der Mehrstufenkarzinogenese . . . . .	9
4.1	Taps-Sequenz . . . . .	61
4.2	Multi-Alignment der bekannten Taps-Homologe . . . . .	62
4.3	Western Blot mit Präimmunserum im Vergleich zu Taps-Antiserum . . . .	64
4.4	Charakterisierung des Anti-Taps-Antikörpers . . . . .	65
4.5	Taps-Expression in adultem Maus-Gewebe . . . . .	67
4.6	Kinetik der Taps-Expression nach TPA-Behandlung . . . . .	69
4.7	Taps-Expression in der Mehrstufenkarzinogenese . . . . .	71
4.8	Taps-Expression in Keratinozytenzelllinien . . . . .	73
4.9	Taps-Expression im humanen Plattenepithelkarzinom . . . . .	74
4.10	Taps-Expression in humanen Tumorproben . . . . .	75
4.11	Taps-Expression in humanen Hautläsionen . . . . .	77
4.12	Taps-Expression nach TPA ist c-Fos-abhängig . . . . .	79
4.13	JunB bindet an den Taps-Promotor . . . . .	80
4.14	Taps-Expression in JunB-k.o.-Mäusen . . . . .	82
4.15	Taps-Überexpression in HT1080-Zellen . . . . .	85
4.16	Nachweis der Proteaseaktivität von Taps . . . . .	87
4.17	Taps-EGFP-Expressionsplasmide . . . . .	88
4.18	Lokalisation von hTaps-EGFP in HEK293-Zellen . . . . .	89



4.19	Etablierung Taps-exprimierender MCA3D-Keratinozyten . . . . .	91
4.20	Klonales Wachstum von Taps-überexprimierenden MCA3D-Zellen . . . . .	93
4.21	E-Cadherin-Expression in Taps-transfizierten Zellen . . . . .	94
4.22	Transgen-Konstrukt zur ubiquitären Überexpression von Taps . . . . .	95
4.23	Histologische Analyse von Rücken- und Schwanzhaut in Taps-transgenen Mäusen . . . . .	97
4.24	Rückenhaut von Taps-transgenen Mäusen nach TPA . . . . .	98
4.25	Taps-Transgen-Konstrukt mit Rinder-Keratin-5-Promotor . . . . .	99
4.26	Kinetik der Entwicklung der adulten Maushaut . . . . .	101
4.27	Taps-Expression und Homöostase der Maushaut . . . . .	102
4.28	Taps-mRNA-Expression nach TPA-Behandlung . . . . .	103
4.29	Histologie der Maushaut nach TPA . . . . .	104
4.30	Differenzierung der Maushaut nach TPA-Behandlung . . . . .	105

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Die Haut

Die Haut ist eines der größten Organe des menschlichen Körpers. Sie hat eine Gesamtfläche von 1,5-2 m<sup>2</sup> und ein Gewicht von 3,5-10 kg [60]. Die Haut übernimmt eine wichtige Rolle beim Schutz des Körpers vor mechanischen Einwirkungen (Zug und Druck), vor chemischen Agenzien, vor Infektionen, vor der Austrocknung und gegenüber Strahleneinwirkungen. Eine der wichtigsten Austauschfunktionen der Haut ist die Wärmeabgabe an die Umgebung durch Schweißbildung und Wasserdiffusion. Darüber hinaus ist die Haut in der Lage, über Rezeptoren Tast-, Temperatur- und Schmerzempfindungen zu vermitteln.

#### 1.1.1 Der Aufbau der menschlichen Haut

Die Haut wird unterteilt in Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Unterhautfettgewebe). Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, das hauptsächlich aus Keratinozyten besteht. Weitere Zellen, die in der Epidermis spezifische Funktionen übernehmen, sind Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und Leukozyten.

## Aufbau der Epidermis

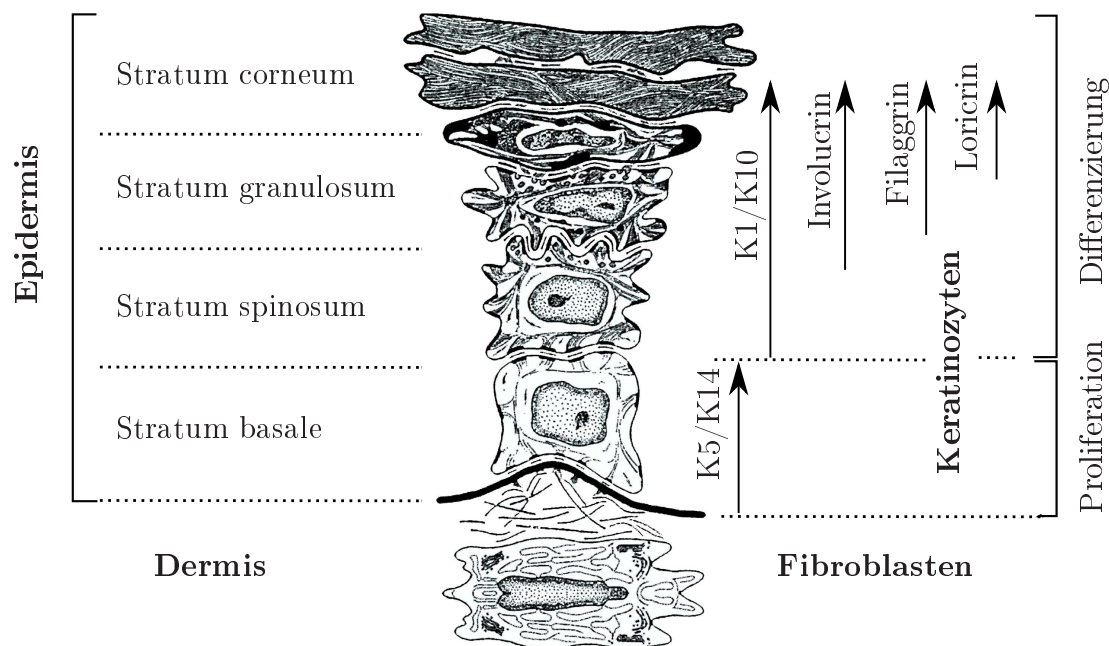
Im histologischen Bild der Epidermis können mehrere Schichten unterschieden werden (Abb. 1.1): Das ***Stratum basale*** ist die Schicht der Epidermis, die direkt der Basalmembran anliegt. Sie besteht aus kubischen Zellen mit großen Kernen und wenig Zytoplasma. Es ist die Zellschicht der Epidermis, in der proliferierende Zellen zu finden sind. Einige wenige Zellen sind sogenannte Stammzellen [29, 96, 113], die für die nahezu unbegrenzte Erneuerungsfähigkeit der Haut verantwortlich sind. Bei der Mitose teilen sich diese Zellen in eine neue Stammzelle und eine Tochterzelle, die *trans(ien)t amplifying cell* genannt wird [95, 21, 6, 91]. Diese Zelle teilt sich einige Male und beginnt dann mit dem Prozess der terminalen epidermalen Differenzierung und der damit verbundenen Wanderung hin zur Oberfläche.

Über dem *Stratum basale* befindet sich das ***Stratum spinosum***. Hier sind die Keratinozyten größer und polygonal. Sie werden in höheren Schichten zunehmend flacher. Eine Verbreiterung von *Stratum basale* und *Stratum spinosum* bezeichnet man als **Akanthose**.

Das zur Oberfläche hin auf das *Stratum spinosum* folgende ***Stratum granulosum*** kann eine bis mehrere Zelllagen umfassen. Die Keratinozyten in dieser Schicht sind durch ihre basophilen Keratohyalin granula in Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnitten deutlich zu erkennen. Eine Verbreiterung des *Stratum granulosum* bezeichnet man als **Hypergranulose**, eine Verringerung als **Hypogranulose**.

Die oberste Schicht der Epidermis ist das ***Stratum corneum***. Die Keratinozyten dieser Schicht sind ganz flach, kernlos und dicht gefüllt mit Keratinfilamenten. Entsteht bei der Verhornung ein kernloses *Stratum corneum*, so spricht man von orthokeratotischer Verhornung (**Orthokeratose**), im Gegensatz zur parakeratotischen Verhornung (**Parakeratose**), bei der in den Hornzellen Kerne erhalten bleiben. Vom *Stratum corneum* werden diese Zellen als Hornschuppen abgeschilfert. Die Wanderungszeit vom *Stratum basale* bis zum *Stratum granulosum* beträgt normalerweise zwei bis drei Wochen, vom *Stratum granulosum* bis zur Hornschuppe noch einmal zwei Wochen [60, 86].

Keratinozyten bestehen im *Stratum corneum* zu einem wesentlichen Teil aus Keratin, das schon in den Basalzellen in Form von Keratinfilamenten gebildet und während der



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung der menschlichen Haut und der Lokalisierung differenzierungsspezifisch exprimierter Proteine verändert nach [12]

terminalen Differenzierung biochemisch verändert wird. Die Keratinfilamente werden aus Polypeptiden, den Zytokeratinen, aufgebaut, die in bestimmten Kombinationen und in einer bestimmten Reihenfolge im Laufe der Differenzierung exprimiert werden. So werden in den Basalzellen die Zytokeratine K5 und K14 produziert [42, 90]. Sie bilden ein dichtes intrazelluläres Netzwerk, das an Desmosomen, welche die Verbindung zwischen benachbarten Zellen herstellen, verankert ist. In den Zellen des *Stratum spinosum* wird die Proteinsynthese dahingehend umgestellt, dass statt der Keratine 5 und 14 die Zytokeratine 1 und 10 [42] sowie das Hüllprotein Involucrin gebildet werden. Die Zellen des *Stratum granulosum* produzieren keine Keratine mehr, sondern vor allem Profilaggrin und Loricrin [84, 107, 41]. Im *Stratum corneum* entsteht durch die Vernetzung von Involucrin und Loricrin mit der Keratohyalin-Matrix eine feste Hülle, der sogenannte „*cornified envelope*“, die für die Barrierefunktion der Haut nötig ist [118]. Die hier genannten Polypeptide werden in Immunfluoreszenz- und immunhistochemischen Experimenten als Differenzierungsmarker zur Kennzeichnung der entsprechenden Schichten der Epidermis verwendet.

## Der Aufbau der Dermis

Die Dermis ist das unter der Epidermis liegende Bindegewebe und kann in zwei Schichten gegliedert werden: das oberflächliche, schmale *Stratum papillare*, das sich in die Räume zwischen den epidermalen Reteleisten erstreckt, und das breite *Stratum reticulare*, das kräftige Kollagenfaserbündel enthält. Hier entspringen die Haarfollikel und Schweißdrüsen, die von hier bis zur Oberfläche der Epidermis reichen. Fibroblasten, die häufigsten Zellen der Dermis, synthetisieren Kollagen-, Retikulin- und elastische Fasern sowie Verankerungsfibrillen. Die Kollagenfasern sorgen wesentlich für die mechanische Stabilität und Dehnbarkeit der Dermis, während Retikulinfasern die Hautanhangsgebilde und die Basalmembran umgeben. Elastische Fasern sind für die Festigkeit und Elastizität der Dermis wesentlich. Verankerungsfibrillen ziehen von der Lamina densa der Basalmembran zu Kollagenfasern der obersten Dermis und sorgen so für die Verankerung der Epidermis in der Dermis.

Weitere Zelltypen in der Dermis sind Histiozyten (aktive Makrophagen), die abgestorbene Zellen und Abbaustoffe wie Melanin, Fette und Proteine speichern und immunologisch aktiv sind, sowie Mastzellen, die allergische und entzündliche Reaktionen vermitteln. Alle Zellen und Fasern sowie Blutgefäße und Nerven sind in eine Matrix aus Wasser, Proteinen, Kohlenhydraten und Proteoglykanen eingebettet. Unter der Dermis liegt das Unterhautfettgewebe, das durch locker angeordnetes Bindegewebe unterteilt wird [60].

### 1.1.2 Die Rückenhaut der Maus

Die Epidermis der Maus entwickelt sich aus einem einschichtigen Ektoderm, das den gesamten Embryo bedeckt [70] und an Tag E5-E6 der Embryonalentwicklung gebildet wird [125]. Die Bildung der Epidermis aus dem Ektoderm wird durch den Wachstumsfaktor BMP4 (*bone morphogenetic protein 4*) induziert [16, 79]. Im Laufe der weiteren Entwicklung beginnt das Epithel mehrschichtig zu werden. Die Initiation der Mehrschichtigkeit wird durch den Transkriptionsfaktor p63 gesteuert [69]. An Tag E10,5 der Embryonalentwicklung wird eine zweite Zellschicht, das Periderm, gebildet, das den Embryo vor

dem Fruchtwasser schützt bis die Epidermis die Barrierefunktion übernehmen kann. Die nächste Zellschicht (*Stratum intermedium*), zwischen Ektoderm und Periderm wird an Tag E13,5 gebildet [132]. Diese Zwischenschicht besteht aus proliferierenden Zellen und ist nur so lange vorhanden bis die eigentliche Schichtenbildung beginnt. Die ersten Zellen des *Stratum spinosum* können ab Tag E15,5 identifiziert werden; sie proliferieren nicht und sind durch die Expression von K1 und K10 charakterisiert [11]. Bei der weiteren Reifung der Epidermis können ab Tag E17-E18 Loricrin und Filaggrin im neu gebildeten *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* detektiert werden [11, 84, 107, 125]. Hierbei wird das Periderm abgeschilfert.

Die Epidermis der neugeborenen Maus, die ca. vier Zelllagen und das *Stratum corneum* umfasst, ist noch weiteren Veränderungen auf dem Weg zur adulten Epidermis ausgesetzt, die nur noch aus ein bis maximal drei Zelllagen unterhalb des *Stratum corneum* besteht.

### 1.1.3 Pathologische Veränderungen der Epidermis

In der Haut werden Proliferation, Differenzierung und Abschilferung der Hornschuppen genau koordiniert, um die Homöostase, die Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichts, der Epidermis zu gewährleisten. Gerät das Verhältnis von Proliferation und Differenzierung durch die Einwirkung energiereicher Strahlung, chemischer Substanzen, durch Entzündungsreaktionen oder durch eine genetische Prädisposition aus dem Gleichgewicht können verschiedenste Hautläsionen entstehen. Als Beispiele können hier Ekzeme, Psoriasis, Lichen ruber, das Keratoakanthom und die aktinische Keratose genannt werden. Ein Ekzem ist laut Definition eine nicht kontagiöse Epidermodermatitis, die klinisch durch Rötung, Knötchen, Bläschen, Nässen und Schuppenbildung, histopathologisch durch herdförmige Spongiose, Akanthose und Parakeratose gekennzeichnet ist. Psoriasis, die Schuppenflechte, ist eine erbliche Dispositionskrankheit, bei der die mitotische Aktivität der Basalzellschicht sehr stark erhöht ist, was zu einer Aufquellung der Epidermis (Akanthose) und einer beschleunigten Differenzierung führt. Dadurch fehlt in der Regel ein *Stratum granulosum* und es kommt zur Hyperkeratose. Die klassische Hautveränderung bei Psoriasis sind scharf begrenzte, entzündliche Papeln mit nicht fest haftender parake-

ratotischer Schuppung. Bei Lichen ruber handelt es sich um eine chronisch entzündliche, nicht kontagiöse und nicht erbliche Erkrankung der Haut und der hautnahen Schleimhäute. Bei der häufigsten Form, dem *Lichen ruber planus*, treten gerötete, scharf begrenzte Papeln in Gruppen oder netzförmigen Feldern auf. Charakteristisch für diese Gruppen oder Felder ist eine feine weißliche Streifung (WICKHAM-Streifung), bei der es sich um die durchscheinende Verdickung des *Stratum granulosum* (Hypergranulose) handelt [60].

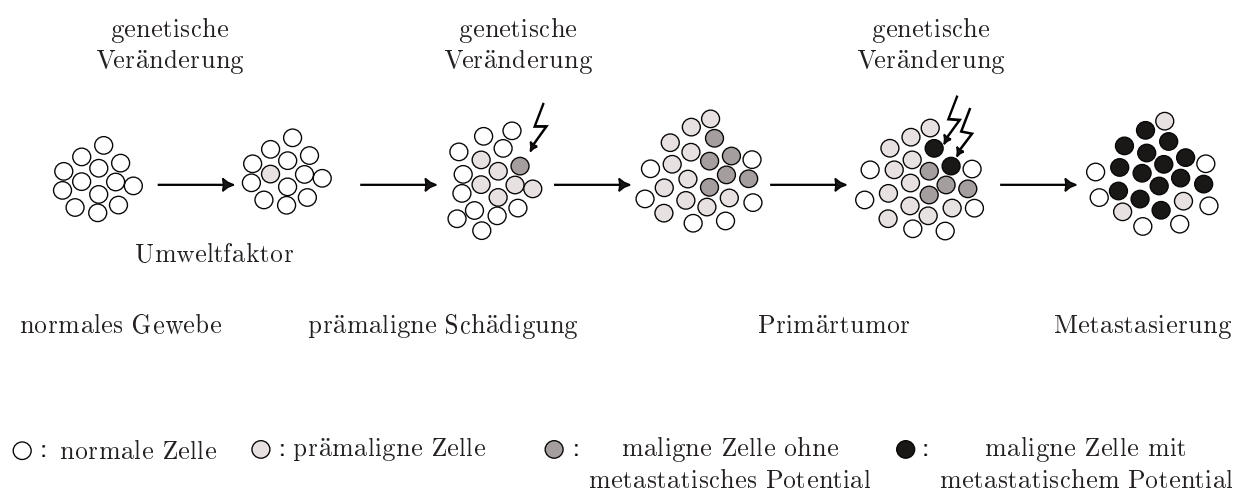
Das Keratoakanthom ist eine sogenannte Pseudokanzerose. Als solche werden Epithelhyperplasien bezeichnet, die mit Entzündung einhergehen und chronisch progredient verlaufen. Ein Keratoakanthom ist ein schnell wachsender epithelialer Tumor, der die Fähigkeit zur Spontanremission besitzt. Die aktinische Keratose (*Keratosis actinica*) gehört zu den Präkanzerosen. Es handelt sich um eine keratotische Veränderung, eine intraepidermale Krebsvorstufe, die in ein Plattenepithelkarzinom (Spinaliom) übergehen kann. Sie tritt auf chronisch lichtexponierter Haut auf, bei der durch UVB-Exposition ein irreparabler Schaden an der DNA der Basalzellen hervorgerufen wurde [60].

## 1.2 Karzinogenese

Die Entstehung epithelialer Tumore ist ein Mehrstufenprozess, der in die Phasen Initiation, Promotion, Progression und Metastasierung unterteilt werden kann [131]. Ursache der Krebsentstehung ist die Ansammlung genetischer und epigenetischer Veränderungen innerhalb einer Zelle [51, 138]. Diese Veränderungen können durch mutagene Chemikalien aber auch durch Viren, energiereiche Strahlung oder Fehler bei der Replikation der DNA hervorgerufen werden. Sie führen dazu, dass streng regulierte zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose nicht mehr ausreichend kontrolliert werden können [48].

Die Karzinogenese beginnt mit einer Mutation, der sogenannten Initiation. Bei dieser Initiation wird die DNA derart geschädigt, dass die Zelle daraus einen Wachstumsvorteil erhält. Dieser Wachstumsvorteil ermöglicht das klonale Auswachsen der initiierten Zelle und damit eine Dysplasie und Hyperplasie des betroffenen Gewebes. Zusätzliche genetische

sche und epigenetische Veränderungen in initiierten Zellen während der Promotion können zur Bildung eines Primärtumors führen, der zunächst lokal begrenzt wächst. Im Stadium der Progression akkumulieren in Zellen eines solchen benignen Tumors weitere genetische Veränderungen, u.a. in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen, die schließlich zur Ausbildung eines malignen und schließlich auch metastasierenden Tumors führen (Abb. 1.2, [135]). Andererseits kommt es in benignen Tumoren, die diese Veränderungen nicht aufweisen, häufig zu einer Regression und der Tumor bildet sich zurück [135].



**Abb. 1.2: Modell der Karzinogenese** Diese Abbildung zeigt die schrittweise maligne Progression von Krebszellen durch Akkumulation genetischer Veränderungen (nach [135]).

Genetische Veränderungen, die sich während der Tumorprogression ereignen, sind Mutationen in Onkogenen, z.B. dem *ras*-Gen, die dadurch aktiviert werden, sowie der Verlust von Chromosomenabschnitten und damit der Verlust bestimmter Tumorsuppressorgene [34]. Zu den epigenetischen Veränderungen, die mit der Tumorprogression in Zusammenhang gebracht werden, gehören Veränderungen in der Methylierung der DNA, die einen Einfluss auf die Aktivierung und damit der Transkription bestimmter Gene hat [74]. Ein Beispiel für die Mehrstufigkeit der Karzinogenese ist das Kolonkarzinom. Hier konnte gezeigt werden, dass Mutationen in mindestens vier bis fünf Genen nötig sind, um ein Karzinom hervorzurufen. Eine geringere Anzahl von Mutationen kann jedoch zur Ausbildung benigner Tumore (Adenome) führen [34, 129].

Charakteristisch für die Progression vom benignen zum malignen Tumor ist die In-

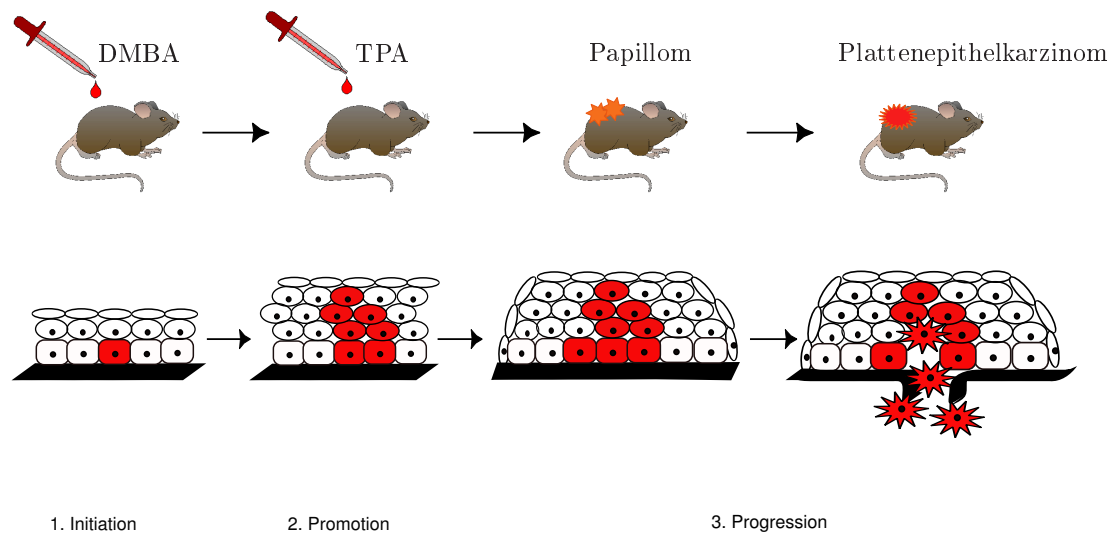


vasion der Tumorzellen durch die Basalmembran und die Wanderung der Zellen in das darunterliegende Stroma. Diese Entwicklung setzt entscheidende Veränderungen in der Zell-Zell-Adhäsion sowie der Interaktion der Zellen mit der sie umgebenden Matrix voraus [138].

### 1.2.1 Mausmodelle zum Studium der Hautkarzinogenese

Für Studien der Hautkarzinogenese existiert ein sehr gut untersuchtes und seit vielen Jahren etabliertes experimentelles Modellsystem: Die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen in muriner Haut nach initiierender Applikation von DMBA, das unter anderem zur Mutation im Ha-*ras*-Proto-onkogen führt, gefolgt von mehrfacher Behandlung mit Tumorpromotoren (Abb. 1.3) [26, 81, 43]. Tumorpromotoren, wie z.B. der Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA), der aktive Bestandteil des Krotonöls [30, 49, 101], verstärken die karzinogen-induzierte Tumorbildung und verändern die Expression von Proto-Onkogenen, Transkriptionsfaktoren, sezernierten Proteasen und Viren [101]. Diese Veränderungen können zur Ausbildung gutartiger, sogenannter benigner Tumore (Papillome) führen, von denen sich einige spontan zu malignen Plattenepithelkarzinomen weiter entwickeln. In diesem Modellsystem kann daher die Entwicklung eines normalen Keratinozyts über das Stadium eines Papilloms bis hin zum Plattenepithelkarzinom und die dabei ablaufenden genetischen und epigenetischen Veränderungen untersucht werden.

Phorbolester rufen in der Haut eine akute Entzündungsreaktion mit Ödembildung und inflammatorischem Infiltrat hervor, die in einer über Tage anhaltenden epidermalen Hyperplasie endet. Diese Reaktion ist unabhängig davon, ob die Haut zuvor mit einem initiierenden Agens behandelt wurde. Der Phorbolester TPA reguliert die meisten Gene auf transkriptioneller Ebene. Darüber hinaus sind wenige Beispiele bekannt, die eine veränderte zytoplasmatische Stabilität der mRNA oder Veränderungen im Export der mRNA aus dem Zellkern aufweisen [101]. Zu den durch TPA induzierten Transkriptionsfaktoren gehören z.B. AP-1 (Aktivator-Protein-1), NF- $\kappa$ B und Ets [75, 120, 111, 15]. Die transkriptionelle Regulation erfolgt durch die Beeinflussung intrazellulärer Signaltransduktionswe-



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese der Mauhaut

1. Die einmalige Behandlung mit DMBA führt zu irreversiblen DNA-Schäden.
2. Durch mehrfache Applikation des Phorbolesters TPA, eines Tumorpromotors, kommt es zur reversiblen, klonalen Expansion der initiierten Zellen und zur Ausbildung von benignen Papillomen.
3. Durch die Akkumulation weiterer genetischer Veränderungen entwickeln sich einige wenige Papillome weiter zu malignen Plattenepithelkarzinomen.

ge, bei der TPA die Stimulierung der Proteinkinase C-Familie über Diazylglyzerol imitiert [81]. Gene, die durch TPA reguliert werden können, spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, in der Zellzykluskontrolle, der Apoptose, der Zelladhäsion, der Differenzierung von Epithelien, dem Zellmetabolismus und der Zellstruktur [112, 56]. Jene Gene, die über die Aktivierung von AP-1 direkt auf die Behandlung von Zellen mit TPA reagieren, verfügen über ein gemeinsames Sequenz-Element nahe des Transkriptionsstarts, das sogenannte „*TPA Responsive Element*“ (*TRE*) [2]. Analysen des humanen Kollagenase-Promotors ergaben eine Konsensus-Sequenz von sieben Basenpaaren ( $TGA^C/GTCA$ ) [1].

Im Vergleich zu gesundem Gewebe tritt im Tumorgewebe eine veränderte Expression verschiedener Proteine auf. Die veränderte Expression und/oder Aktivität betrifft Proteine, die an der Reaktion der Zelle auf wachstumsstimulierende oder wachstumshemmende Faktoren beteiligt sind. Sie ermöglichen es den Zellen, apoptoseinduzierenden Signalen zu widerstehen und sich unbegrenzt zu teilen. Darüber hinaus ist die Expression

von Proteinen verändert, die das Wachstum von Blutgefäßen (Angiogenese) stimulieren, oder die Invasion in andere Gewebe und die Metastasierung in anderen Organen ermöglichen [48]. Diese Veränderungen in der Physiologie der Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen können auf eine veränderte Signaltransduktion zurückgeführt werden, die Auslöser oder Resultat einer veränderten Proteinexpression sein kann. Die Genexpression ist abhängig von verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Eine der bekanntermaßen mit der Genexpression nach Strahlung, Karzinogen- und Tumorpromotor-Einwirkung in Zusammenhang stehende Gruppe von Transkriptionsfaktoren ist die Familie der AP-1 (Aktivator-Protein-1)-Transkriptionsfaktoren [3]. AP-1 steht für eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, deren dimere Proteinkomplexe aus Mitgliedern der Jun (c-Jun, JunB und JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2) und ATF (ATFa, ATF-2, und ATF-3) Familien aufgebaut werden. Die unterschiedlichen Homo- und Hetero-Dimere binden an *TPA responsive elements* (TREs) in der Promotorregion der Zielgene und können jeweils spezifische Reaktionen der Zelle regulieren, z.B. Proliferation und Differenzierung. In der Epidermis zeigen die AP-1-Untereinheiten ein spezifisches Expressionsmuster in den unterschiedlichen Keratinozytenschichten [5, 4, 83]. Die vorhandenen Daten sprechen dafür, dass AP-1 sowohl an der normalen Entwicklung der Epidermis wie auch an pathologischen Reaktionen der Haut beteiligt ist. Die Zielgene schließen GM-CSF und KGF [121, 4], die Transglutaminase, verschiedene Zytokeratine (K1, K5, K6, K8, K14, K19) [54, 88], sowie Involucrin und Loricrin ein ([5] und darin angeführte Literaturquellen). Darüber hinaus ist mittlerweile bekannt, dass diverse Zytokine (Pleiotrophin, SDF-1, Gro-1, Mip-2, Lipocalin-2), welche eine Rolle in der dermalen-epidermalen Kommunikation spielen, von c-Jun bzw. JunB reguliert werden [37, 39, 38]. In zahlreichen Studien in der Zellkultur und in Mäusen konnte gezeigt werden, dass AP-1 eine regulatorische Funktion in der Wundheilung, der vorzeitigen Hautalterung durch UV-Einwirkung und der Krebsentstehung übernimmt ([5] und darin angeführte Literaturstellen, [38]). Mäuse, die in der Epidermis eine dominant-negative Mutante von c-jun (TAM67) exprimieren, bilden nach Behandlung mit DMBA und TPA sehr viel seltener Papillome als Wildtyp-Mäuse [136]. Bei c-Fos-defizienten Mäusen entwickeln sich Papillome nicht zu malignen Tumoren weiter [109]. Insgesamt weniger

Hauttumore werden in Mäusen gebildet, in denen c-Jun nicht N-terminal phosphoryliert werden kann und in deren Zellen der Ras-Signaltransduktionsweg durch eine aktivierte Form von SOS (K5-SOS-F) konstitutiv aktiv ist [8, 117]. In Mäusen, die in der Haut sowie den Immunzellen kein JunB exprimieren, kommt es nach Verwundung oder Behandlung mit TPA zu einer überschießenden epidermalen Proliferations- und Immunreaktion [38] und bei transgenen Mäusen, die weder c-Jun noch JunB in der Epidermis exprimieren, zeigt die Haut Läsionen, die Psoriasis ähneln [140]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AP-1 für die Antwort auf Stressstimuli, die Promotion und die Progression von Tumoren eine bedeutende Rolle spielt.

### 1.3 Die Identifizierung von Taps

Mit Hilfe einer *Suppression Subtractive Hybridisation* (SSH) wurden verschiedene Gene identifiziert, deren Expression in der Maushaut nach Behandlung mit dem Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) induziert ist [13].

Eines der hierbei identifizierten, bisher unbekannten Gene wurde zunächst *TAP70* (**T**umor-**A**ssoziiertes **P**rotein **70**) genannt. Die durch den SSH identifizierte cDNA wurde sequenziert und ersten Analysen unterzogen. Ein Vergleich der Sequenz mit Gen-Datenbanken zeigte, dass das Gen für TAP70 bei der Maus auf Chromosom 6 liegt und keine Introns besitzt. Homologe des *tap70*-Gens konnten bei Mensch (Chromosom 2) und Ratte (Chromosom 4) identifiziert werden. Während der vergangenen drei Jahre wurden darüber hinaus auch Homologe bei Schimpanse (Chromosom 2), Rind (Chromosom 11) und Hund (Chromosom 10) bekannt. Die Analyse der Proteinsequenz zeigte eine potentielle Transmembrandomäne und eine Proteasedomäne, die Ähnlichkeit mit der funktionellen Domäne retroviraler Aspartylproteasen hat. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde *tap70* umbenannt in ***taps*** (***T***PA-inducible ***a***spartic ***p***roteinase like gene in ***s***kin). *In situ*-Hybridisierungen zeigten, dass die Expression von *taps* in der Embryonalentwicklung zwischen Tag E12,5 und E16,5 in Epidermis, Zunge und Nasenschleimhaut beginnt. In der adulten Maus konnte *taps* in Haarfollikeln der Haut sowie in suprabasalen Keratinozyten

von Zunge, Ösophagus und Lippe detektiert werden [99]. Hautproben aus Experimenten zur Mehrstufenkarzinogenese nach DMBA/TPA-Behandlung zeigten *taps*-Expression in suprabasalen Keratinozyten hyperplastischer Haut, in Papillomen sowie in Plattenepithelkarzinomen [105].

Durch Transfektion eines Expressionsplasmids, das die kodierende cDNA-Sequenz für Taps enthielt, und die Analyse von Proteinextrakten und Kulturüberständen, konnten in HT1080-Fibrosarkomzellen drei intrazelluläre und eine extrazelluläre Proteinvariante von Taps nachgewiesen werden. Daher könnte Taps sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zellen, die es exprimieren, eine Funktion übernehmen. Es wurde angenommen, dass die Bildung der Varianten durch Proteolyse und ein alternatives Startkodon reguliert wird. In den verwendeten HT1080-Zellen konnte bei Wachstum in Kulturmedium mit 10% FCS keine Veränderung der Morphologie, wohl aber der Wachstumsrate in Taps-transfizierten Zellen gegenüber Kontrollzellen nachgewiesen werden. Unter Serumentzug lösten sich die Kontrollzellen von der Kulturschale, während Taps-exprimierende Zellen am Untergrund haften blieben. Serumentzug bewirkte darüber hinaus eine Abnahme der im Kulturüberstand nachweisbaren extrazellulären Form von Taps [99].

Aufgrund der Proteinsequenz von Taps besteht, wie bereits erwähnt, eine Homologie zu retroviralen Aspartylproteasen. Aus der Literatur [134] war bekannt, dass diese Aspartylproteasen dimerisieren müssen, um funktionell aktiv werden zu können (s. Abschnitt 1.4). Säulenchromatografische Experimente mit Kulturüberständen und Zellextrakten transfizierter Zellen zeigten, dass Taps ebenfalls dimerisiert und sogar Teil eines größeren Proteinkomplexes sein kann [99].

## 1.4 Aspartylproteasen

Aspartylproteasen, auch saure oder Carboxyproteasen genannt, bilden neben Serin-, Threonin-, Metallo- und Cysteinproteasen die fünfte Gruppe der proteolytischen Enzyme. 3,8% aller Proteasen beim Menschen und 4,3% aller Proteasen bei der Maus sind Aspartylproteasen. Damit stellen sie nur einen recht kleinen Anteil an der Gesamt-

zahl der Proteasen, deren größte Gruppe die Metallo- (Mensch) bzw. die Serinproteasen (Maus) sind [100]. Charakteristisch für Aspartylproteasen ist die zweifach vorhandene Asp-Thr/Ser-Gly-Sequenz ( $D^T/S$ G) im aktiven Zentrum [119]. Die Mutation eines der Aspartylreste im aktiven Zentrum genügt, um eine enzymatische Aktivität zu verhindern [46, 76, 68, 116, 133]. Abgesehen von der üblichen Einteilung der Aspartylproteasen in verschiedene Gruppen aufgrund der katalytischen Reste (s. MEROPS Peptidase Datenbank, <http://merops.sanger.ac.uk/>, [7]) wäre eine Klassifizierung in zwei Gruppen anhand der Anzahl proteolytischer Domänen möglich. Die erste Gruppe verfügt nach dieser Einteilung schon als Monomer über ein funktionsfähiges aktives Zentrum mit zwei proteolytischen Domänen (Pseudodimere). In diese Gruppe gehören z.B. Renin, das bei Säugetieren Angiotensinogen in Angiotensin umwandelt [20], sowie Pepsin, Cathepsin D und Cathepsin E. Die zweite Gruppe verfügt nach dieser Einteilung nur über eine proteolytische Domäne und bildet daher erst nach Dimerisierung ein funktionsfähiges aktives Zentrum. In diese Gruppe gehören die retroviralen Aspartylproteasen, z.B. die HIV-Protease. Da Taps ebenfalls nur über eine dieser DSG-Sequenzen verfügt, die für die Bildung des aktiven Zentrums benötigt werden, ist der Aufbau vermutlich vergleichbar mit dem der retroviralen Aspartylproteasen.

Aspartylproteasen werden als inaktive Zymogene mit einem N-terminalen Fragment synthetisiert, das ca. 45 Aminosäuren lang ist und zur Aktivierung der Protease abgespalten werden muss. Diese Abspaltung des Propeptids vom Zymogen findet autoproteolytisch bei niedrigem pH statt [22]. Für einige Aspartylproteasen (Angiotensin converting enzyme (ACE), Cathepsin D) sind mehrere proteolytische Spaltungen der Pro-Form bis hin zum aktiven Protein beschrieben. Für Cathepsin D ist beispielsweise bekannt, dass es als Procathepsin D von 52 kDa Molekulargewicht synthetisiert wird, dann aktiviert und anschließend weiter proteolytisch in das reife Cathepsin D (31 und 14 kDa) gespalten wird [20].

Aspartylproteasen können sowohl intrazellulär, z.B. Cathepsin D und Cathepsin E, als auch als sezernierte Formen, z.B. Renin, Pepsin und ebenfalls Cathepsin D (s.u.), ihre Funktion ausüben. Es gibt verschiedene Beispiele für die Beteiligung von Aspartyl-

proteasen an tumorigenen und anderen pathologischen Vorgängen: Die Expression von Cathepsin D spielt eine wichtige Rolle beim invasiven Wachstum der Tumorzellen im Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre [58]. Berchem et al. vermuten, dass humanes Cathepsin D als mitogener Faktor auf endotheliale Zellen und Tumorzellen wirkt [9]. Kawada et al. zeigen, dass Cathepsin D an der lokalen Invasion von Plattenepithelkarzinomen beteiligt ist [63, 64].

Darüber hinaus ist Cathepsin D die einzige Aspartylprotease, deren Funktion in der Epidermis bisher analysiert wurde. Cathepsin D ist an der Regulation von Transglutaminase 1 und der epidermalen Differenzierung beteiligt. Es wird in allen suprabasalen Schichten der Epidermis exprimiert, allerdings liegt es nur im *Stratum granulosum* und im *Stratum corneum* in der aktiven Form vor [52]. Cathepsin D aktiviert Transglutaminase, welche für die Verknüpfung von Involucrin und Loricrin und damit bei der Bildung des *cornified envelope* eine entscheidende Rolle spielt [33]. Für die Homöostase der Haut wird Cathepsin D noch eine weitere wichtige Funktion zugeschrieben: die Wanderung der Keratinozyten in der Haut endet damit, dass sie als Hornschuppen von der Oberfläche des *Stratum corneum* abgeschilfert werden. Die Desmosomen, welche die Keratinozyten in der Epidermis verbinden, müssen dazu proteolytisch gespalten werden. Diese wichtige Funktion übernimmt Cathepsin D, das in den oberen Schichten des *Stratum granulosum* und am Übergang zum *Stratum corneum* in die interzellulären Zwischenräume sezerniert wird [53, 57].

## 1.5 Fragestellungen

*Taps* wurde als TPA-induzierbares Gen in der Rückenhaut der Maus identifiziert. Aus Vorarbeiten [99] war bekannt, dass die Expression von *taps*-mRNA in mehrschichtigen, unverhornten Epithelien, in einzelnen Keratinozyten der Epidermis sowie in Zellen des Haarfollikels detektiert werden kann. Ferner war in Hauttumoren aus dem chemisch induzierten Karzinogenesemodell der Mauhaut die mRNA-Expression von *taps* auf differenzierende Zellen beschränkt. In der Sequenz des Taps-Proteins konnte in Vergleichen

mit Proteindatenbanken Homologien zu retroviralen Aspartylproteasen identifiziert werden und die bisher durchgeführten Analysen haben ergeben, dass Taps in verschiedenen Varianten in Fibrosarkomzellen exprimiert wird.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die molekulare Funktion von Taps innerhalb der Differenzierung und Homöostase mehrschichtiger Epithelien zu identifizieren, um seine Eignung als Biomarker für epitheliale Läsionen und als Zielstruktur für therapeutische Ansätze beurteilen zu können. Im Hinblick darauf wurden die folgenden Themenkomplexe zur Charakterisierung von Taps bearbeitet:

1. Das Expressionsprofil:

Wie wird Taps als Protein in normalen und pathologisch veränderten Geweben bei Maus und Mensch exprimiert?

2. Die biochemische Charakterisierung:

Welche Taps-Varianten gibt es in Epithelzellen und wie entstehen sie? Ist Taps eine funktionell aktive Aspartylprotease?

3. Die funktionelle Charakterisierung:

Welche Wirkung hat die exogene Expression von Taps in Zellkultursystemen (*in vitro*) und Mausmodellen (*in vivo*)?



# Kapitel 2

## Materialien und Lösungen

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

<i>Abi prism 310 Genetic Analyser</i>	Abi prism, Darmstadt
Bakterienplatten	Greiner, Frickenhausen
Bakterienschüttler	Infors AG, Bottmingen
Begasungsbrutschrank (Zellkultur)	Heraeus, Hanau
Binokular	Leica, Wetzlar
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus, Hanau
„Corex“-Röhrchen	Schott, Mainz
DNA-Gelkammern	Cadillac-Plastic, USA
Drehrad	cti, Idstein
Einbettungsmaschine <i>Tissue Tek TES</i>	Vogel, Giessen
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, USA
Elektrophorese-Kammer	BioRad, München
<i>Elisa-Reader</i>	Titertek, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
<i>Falcon-Röhrchen</i>	Greiner, Frickenhausen
Feinwaage	Ohaus, Giessen

Fettstift	Vectorlabs, USA
Filmkassetten	Rego, Augsburg
Fusselfreie Tücher	Kimberly-Clark, USA
Handschuhe	Kimberly-Clark, USA
Heizblock	Grant, UK
Hybridisierungsöfen	Bachhofer, Reutlingen
Kryoröhrchen <i>Lip Seal 2ml</i>	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
Kimwipes	Kimberly-Clark Corporation, USA
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, München
Kühlzentrifuge 2K-15	Sigma, München
Küvetten	Hellma, Müllheim/Baden
Mikroskope	Leica, Wetzlar
Mikrotom RM 2155	Leica, Wetzlar
Mikrowellengerät	Bosch, Karlsruhe
<i>Northern Blot</i> Hybond N+ Membran	Amersham Pharmacia, Freiburg
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	American National Can, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
PCR- <i>Cycler</i>	MJ Research, USA
PCR-Gefäße	Greiner, Frickenhausen
PE-Gefäße (Maxi-Präparation)	Nalgene, USA
pH-Messgerät	Knick, Berlin
Photoaufsatz (Mikroskop DMIL)	Leica, Wetzlar
Photometer <i>GeneQuant pro</i>	Amersham Pharmacia, Freiburg
<i>Pipetboy</i>	BrandTech, USA
Pipetten	Gilson, USA
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym, Hessisch Oldendorf
Plastikkassetten (Paraffineinbettung)	Polysciences, USA
Proteingel-Kammern	Sigma-Aldrich, USA

RNA-Gelkammern	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilme Fuji RX	Fuji, Düsseldorf
Röntgenfilm-Entwickler	Optimax Protec, Düsseldorf
Sicherheitswerkbank	The BAKER Company, USA
	Heraeus, Hanau
Spannungsgerät	BioRAD, USA
Szintillationszähler	Hidex, Finnland
Schüttler (waagrecht)	Ika Labortechnik, Staufen
Thermoblock	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Tischzentrifuge	Tomy Kogyo Co. Ltd, Japan
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
<i>Ultra-Turrax</i> T25	Ika Labortechnik, Staufen
UV-Leuchttisch	Stratagene, Niederlande
UV-Stratalinker	Stratagene, Niederlande
Waage (Wägeraum)	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	Leica, Wetzlar
	Rommelsbacher, Dinkelsbühl
	GFL, Burgwedel
Wassermann-Röhrchen	Schott, Mainz
<i>Western Blot</i> -Apparatur	BioRAD, München
<i>Western Blot</i> -Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
<i>Whatman 3 MM</i> -Papier	Sartorius, Göttingen
Zellzählgerät <i>Coulter Counter</i>	Beckman Coulter, USA
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Zentrifuge J2-HS	Beckman, München
Zentrifuge Varifuge 3.OR	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5403	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau

## 2.2 Chemikalien

Azeton	Fisher Scientific, UK
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar für Bakteriologie	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Roche, Mannheim
Bisbenzimid H33342 Fluorochrom	Calbiochem, USA
Borsäure	Fluka Chemicals, Schweiz
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Casamino-säuren	Becton Dickinson, Heidelberg
Chloroform	J.T.Baker, USA
Deoxycholsäure Na <sup>+</sup> -Salz	Fluka Chemicals, Schweiz
Dextransulfat	Sigma, Taufkirchen
3',3'Diaminobenzidin (DAB)	Linaris, Wertheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Fluka Chemicals, Schweiz
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
DNA-Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Entellan	Merck, Darmstadt
<i>Enhanced Chemoluminescence</i> Lösung (ECL)	Perkin Elmer LAS, Rodgau-Jügesheim
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure	J.T. Baker, USA
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol (EtOH)	Riedel-deHaën, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe

Glyzerin für die Fluoreszenzmikroskopie	Merck, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hämatoxylin	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff (Urea)	Fluka Chemicals, Schweiz
Hefeextrakt für die Bakteriologie	GERBU Biotechnik, Gaiberg
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure (HEPES, $C_8H_{18}N_2O_4S$ )	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	Ferck, Darmstadt
Kalziumchlorid ( $CaCl_2$ )	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Kupfersulfat ( $CuSO_4$ )	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel-deHaën, Seelze
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Natriumacetat-Trihydrat ( $NaOAc$ )	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat ( $Na_2CO_3$ )	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Fluka Chemicals, Schweiz
Natriumchlorid ( $NaCl$ )	Fluka Chemicals, Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ )	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Natriumhydroxid ( $NaOH$ )	Merck, Darmstadt
Natrium-Kalium-Tartrat	Fluka Chemicals, Schweiz
Nonidet P40 (NP-40)	Fluka Chemicals, Schweiz
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem, Darmstadt
Paraffin	Vogel, Giessen
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phalloidin Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Molecular Probes, USA
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglycol 400 (PEG 400)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

<i>Ponceau S</i> -Lösung	Sigma, Taufkirchen
Proteinmarker (denaturiert, gefärbt)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Riedel-deHaën, Seelze
Szintillationsflüssigkeit	Beckman, München
<i>Talon Metal Affinity Resin/Talonbeads</i>	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	Sigma, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Triethanolamin	Sigma, Taufkirchen
Tris-base	Roth, Karlsruhe
Tris-hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin (IHC)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-Inhibitor (IHC)	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Fluka Chemicals, Schweiz
Trypton für die Bakteriologie	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	AppliChem, Darmstadt
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Xylol	Fluka Chemicals, Schweiz

Zusätzliche allgemein gebräuchliche Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

## 2.3 Kits

<i>peqGOLD RNAPure™</i>	peqLab, Erlangen
<i>DAB Substrate Kit</i>	Vectorlabs, USA
<i>redi prime™ II</i>	Amersham Pharmacia, Freiburg
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim
<i>QIAquick Gel-Extraktions-Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>NucTrap® Probe Purification Columns</i>	Stratagene, Niederlande
<i>Vectastain® ABC Kit</i>	Vectorlabs, USA

## 2.4 Molekulargewichtsmarker

<i>Gene Ruler™ DNA Ladder Mix</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>PageRuler™ Prestained Protein Marker</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Primärantikörper

Anti-Taps (Kaninchen)	Eurogentec, Belgien
Anti-myc (Maus)	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Aktin (Kaninchen)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Caspase-14 (Ziege)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Keratin 5 (Kaninchen)	Lutz Langbein, DKFZ
Anti-Keratin 10 (Kaninchen)	Covance, USA
Anti-Loricrin (Kaninchen)	Covance, USA
Anti-Filaggrin (Kaninchen)	Abcam, USA
Anti-PCNA (Maus)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PDI (Ziege)	Stressgen, Kanada

## 2.5.2 Sekundärantikörper

Anti-Kaninchen (Ziege), HRP	DAKO, Hamburg
Anti-Maus (Ziege), HRP	DAKO, Hamburg
Anti-Ziege (Esel), HRP	DAKO, Hamburg
Anti-Kaninchen (Ziege), Cy3	Dianova, Hamburg
Anti-Maus (Ziege), Cy3	Dianova, Hamburg
Anti-Ziege (Esel), Cy3	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen (Ziege), Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Molecular Probes, USA
Anti-Maus (Ziege), Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Molecular Probes, USA

## 2.6 Radiochemikalien

<sup>32</sup> P-dCTP	Amersham, Freiburg
<sup>35</sup> S-ATP	Amersham, Freiburg

## 2.7 Oligonukleotide

Tabelle 2.1 gibt die Sequenzen der Oligonukleotide an, die für Sequenzierungsreaktionen verwendet wurden.

Oligonukleotid	Sequenz
<i>T7 forward</i>	5' - gta ata cga ctc act ata ggg c - 3'
<i>M13 reverse</i>	5' - gga aac agc tat gac cat g - 3'

**Tabelle 2.1:** Oligonukleotide zur Sequenzierung



Tabelle 2.2 listet die Oligonukleotide auf, die für den Nachweis der endogenen Tapsexpression (m/hTaps forward / m/hTaps reverse) bzw. der Transgen-Expression (mTaps sense/mTaps myc) und zur Kontrolle der cDNA-Qualität und -quantität verwendet wurden. Darüber hinaus enthält sie die Oligonukleotidsequenzen, die zur Klonierung der dominant negativen Taps-Variante verwendet wurden.

Oligonukleotid	Sequenz
<i>mTaps forward</i>	5' - aag ctt gcc caa ggc cgg gca agt c - 3'
<i>mTaps reverse</i>	5' - ggg ccc cag agt cca cca g - 3'
<i>mTaps sense1</i>	5' - aga caa agc tga agg ccg ag - 3'
<i>mTaps myc</i>	5' - cct ctt ctg aga tga gtt ttt gtt cg - 3'
<i>hTaps forward2</i>	5' - agc cac ctg ccc aaa gag at - 3'
<i>hTaps reverse3</i>	5' - aca ccc agg atc ttc att tca gc - 3'
<i>cre neu forward</i>	5' - ggc gcg gca aca cca ttt tt - 3'
<i>cre neu reverse</i>	5' - ccg ggc tgc cac gac caa - 3'
<i>DN-Taps forward</i>	5' - tcc tga agg cct ttg ggg tc - 3'
<i>DN-Taps reverse</i>	5' - ggt gaa ttc tgg ggc cca ggt c - 3'
<i>mHpvt forward</i>	5' - gct ggt gaa aag gac ctc t - 3'
<i>mHpvt reverse</i>	5' - cac agg act aga aca cct gc - 3'
<i>gapdh forward</i>	5' - acc aca gtc cat gcc atc act - 3'
<i>gapdh reverse</i>	5' - tac agc aac agg gtg gtg ga -3'
<i><math>\beta</math>-tubulin forward</i>	5' - gga aca tag ccg taa act gc - 3'
<i><math>\beta</math>-tubulin reverse</i>	5' - tca ctg tgc ctg aac tta cc- 3'

**Tabelle 2.2:** Oligonukleotide zur Bestimmung des internen Standards und Taps-spezifische Oligonukleotide

Tabelle 2.3 enthält die Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Proteinbindungsanalysen (EMSA) verwendet wurden.

Oligonukleotid	Sequenz
<i>Ko-TRE forward</i>	5' - agc taa agt ggt gac tca tca cta t - 3'
<i>Ko-TRE reverse</i>	5' - agc tat agt gat gag tca cca ctt t - 3'
<i>Taps-TRE forward</i>	5' - agc tga atg tat gag tca cct tat c - 3'
<i>Taps-TRE reverse</i>	5' - agc tga taa ggt gac tca tac att c - 3'
<i>MutTaps-TRE forward</i>	5' - agc tga atg tat ggc gca cct tat c - 3'
<i>MutTaps-TRE reverse</i>	5' - agc tga taa ggt gcg cca tac att c - 3'
<i>Oct forward</i>	5' - gcg gac ctg ggt aat ttg cat ttc taa aat - 3'
<i>Oct reverse</i>	5' - tgg acc cat taa acg taa aga ttt tag gcg - 3'

**Tabelle 2.3:** Oligonukleotide für Proteinbindungsanalysen

Tabelle 2.4 listet die Oligonukleotide auf, die verwendet wurden, um das offene Leseraster der murinen Caspase-14 über die Schnittstellen EcoRI und XhoI in den Vektor pcDNA3.1(C) zu klonieren. Die Oligonukleotide für die humane Caspase 14 enthielten die Sequenzen für EcoRI- und BamHI-Schnittstellen, um eine Klonierung in das offene Leseraster des pBSK-NFlag-Vektors zu ermöglichen.

Oligonukleotid	Sequenz
<i>mCaspase-14 EcoRI forward</i>	5' - tgc tga att cca gac atg gag tca - 3'
<i>mCaspase-14 XhoI reverse</i>	5' - tgc cct cga gtt tat tgc aaa tag ag - 3'
<i>hCaspase-14/EcoRI forward</i>	5' - acc cga att ccc aat gag caa tcc gcg gtc ttt g - 3'
<i>hCaspase-14/BamHI reverse</i>	5' - ccg gga tcc cta ctg cag ata cag ccg tt - 3'

**Tabelle 2.4:** Oligonukleotide zur Klonierung von Caspase-14

## 2.8 Zellkultur

$\alpha$ -MEM	BioWhittaker, Belgien
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	PAA Laboratories, Österreich
Fötales Rinderserum (FCS)	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	PAA Laboratories, Österreich
Geneticin (G418)	PAA Laboratories, Österreich
Trypsin	BioWhittaker, Belgien
<i>GenePORTER™ Transfection Reagent</i>	PeqLab, Erlangen

## 2.9 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Spezies	Quelle	Literaturnachweis
HT1080	Fibrosarkom-Zellen	human	DKFZ, Heidelberg	[102]
HeLa	Zervixkarzinomzellen	human	DKFZ, Heidelberg	
HEK 293	embryonale Nierenzellen	human		[47]
HEK 293T	embryonale Nierenzellen, transformiert mit <i>large T Antigen</i> des SV40 Virus	human	S. Textor, DKFZ, Heidelberg	

Zelllinie	Beschreibung	Spezies	Quelle	Literaturnachweis
MCA3D	Keratinocyten; nicht tumorigen	murin	G. Fürstenberger und F. Marks, DKFZ, Hei- delberg	[72]
Reb	Keratinocyten; nicht tumorigen	murin		/
SP1	Keratinocyten; benigne Tumore	murin		/
308	Keratinocyten; benigne Tumore	murin		[137]
PMK-R3	Keratinocyten; maligne Tumore	murin		[103]
3P2	Keratinocyten; maligne Tumore	murin		[128]
Peca	Keratinocyten; maligne Tumore	murin		[71]
PDV	Keratinocyten; maligne Tumore	murin		[44, 45]
CarB	Keratinocyten; maligne Tumore	murin		

## 2.10 Murines Tumormaterial

### 2.10.1 TPA-behandelte Haut

Die Rückenhaut von C57/BL6- bzw. NMRI-Mäusen wurde vorsichtig rasiert und anschließend mit 10 nmol TPA in 100  $\mu$ l Azeton behandelt [112]. Für die Analyse der Hautreaktion auf die einmalige Applikation von TPA wurden die Tiere nach den im Text bzw. den Abbildungsunterschriften angegebenen Zeitpunkten durch Genickbruch getötet. Für die Analyse der Reaktion auf eine chronische Behandlung, wurde die Applikation von TPA

im Abstand von jeweils 48 Stunden noch zweimal wiederholt und die Tiere 48 Stunden nach der letzten Behandlung durch Genickbruch getötet.

### 2.10.2 Papillome und Plattenepithelkarzinome

Die durch die chemisch induzierte Mehrstufenkarzinogenese der Maushaut hervorgerufenen Papillome und Plattenepithelkarzinome wurden freundlicherweise von G. Fürstenberger, DKFZ, bereitgestellt [43].

## 2.11 Humanes Hautmaterial

Haut-Biopsien mit Ekzemen, Psoriasis, aktinischer Keratose und Lichen ruber wurde freundlicherweise von C. Mauch, Universitätsklinik Köln, zur Verfügung gestellt. Die Patienten unterzeichneten die Einverständniserklärung der Abteilung für Dermatologie der Universität Köln mit der Genehmigung der Ethikkommission (Az. 9645/96). Die Gewebe-*Microarrays* wurden freundlicherweise von Kai Breuhahn, Universitätsklinikum Heidelberg zur Verfügung gestellt.

## 2.12 Klonierungen

Vektor pcDNA3.1 <sup>®</sup> /His-myc(C)	Invitrogen, Karlsruhe
Vektor pBluescript II SK+	Stratagene, Niederlande
Vektor pGEM-T	Promega, Mannheim

## 2.13 Bakterienstämme

*E. coli* XL-1 blue

Genotyp: F':::Tn10 *proAB+lacI<sup>q</sup>*  $\Delta$ ZM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, (Nal<sup>r</sup>), *thi*, *hsdR17* (*r $\kappa$* -, *m $\kappa$* +), *supE44*, *relA1*, *lac*

## 2.14 Enzyme, Puffer

Alkalische Phosphatase (+ Puffer)	Roche, Mannheim
AMV Reverse Transkriptase (+ Puffer)	Promega, Mannheim
DNase I (+ Puffer)	Promega, Mannheim
Klenow-Polymerase (+ Puffer)	Promega, Mannheim
dNTPs	Promega, Mannheim
oligo(dT)	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsenzyme (+ Puffer)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, Frankfurt/Main Promega, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
RNasin	Promega, Mannheim
T4-DNA-Ligase (+ Puffer)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach

## 2.15 Lösungen

- **10x PBS<sup>-/-</sup>**: 1,5 M NaCl, 27 mM KCl, 82 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O , 17mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O
- **10x GB-Puffer für PCR**: 166 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris pH 8,8, 67 mM MgCl<sub>2</sub>, 67 μM EDTA, 54 mM β-Mercaptoethanol
- **10x DNA-Ladepuffer**: 50% Glyzerin, 0,2% Xylencyanol, 0,2% Bromphenolblau, 40 mM EDTA
- **10x TBE**: 1 M Tris, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA
- **RIPA-Puffer**: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% Deoxycholsäure Na<sup>+</sup>-Salz, 1% NP-40

- **PP100-Puffer:** 25 mM Tris-HCl pH 7,8, 5 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% Glyzerin, 0,1% NP-40
- **Lowry-Lösungen:**
  - Lowry-I: 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0,1 N NaOH = 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 2 g NaOH in 500 ml ddH<sub>2</sub>O
  - Lowry-II: 2% Na-K-Tartrat = 2 g Na-K-Tartrat in 100 ml ddH<sub>2</sub>O
  - Lowry-III: 1%  $\text{CuSO}_4$  = 1 g  $\text{CuSO}_4$  in 100 ml ddH<sub>2</sub>O
  - Lowry-IV: 100  $\mu\text{l}$  Lowry-II + 10 ml Lowry-I mischen, + 100  $\mu\text{l}$  Lowry-III, immer frisch ansetzen
- **Mowiol:**

Glyzerin	6 g
Mowiol 4-88	2,4 g
H <sub>2</sub> O	6 ml

auf einem Drehrad über Nacht mischen. Am nächsten Tag werden 12 ml 200 mM Tris pH 8.5 hinzugegeben und die Mischung 30 Minuten bei 50-60°C inkubiert. Nachdem das Mowiol auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird es 10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.
- **10x Natriumdodecylsulfat(SDS)-Laufpuffer:** 250 mM Tris-base, 1,92 M Glyzin, 1% SDS,
- **2x Lämmli-Puffer:** 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% Glyzerin, 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol, Bromphenolblau
- **Western-Transferpuffer:** 25 mM Tris-base, 190 mM Glyzin, 20% Methanol
- **Ponceau S-Lösung:** 0,1% Ponceau S-Stocklösung, 1,5% Trichloressigsäure in H<sub>2</sub>O

- **TY-Medium:** 5 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton, 10 g Hefe-Extrakte, 1 g Casamino-säuren auf einen Liter Medium
- **1 M Phosphatpuffer (Northern Blot):** 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 85% ortho-Phosphorsäure
- **Zitratpuffer für Immunfluoreszenz:**  
 Lösung A (0,1 M Zitronensäure): 21,0 g Zitronensäuremonohydrat auf 1 l  $\text{H}_2\text{O}$   
 Lösung B (0,1 M Natriumzitrat): 29,4 g Trinatriumcitratdihydrat auf 1 l  $\text{H}_2\text{O}$
- **PBS<sup>-/-</sup>/EDTA:** 100 ml 10x PBS<sup>-/-</sup>, 200 mg EDTA · 2Na · 2H<sub>2</sub>O auf einen Liter
- **10x RB-Restriktionspuffer**

Konzentration	20x RB <sup>-/-</sup>	10 mM DTE	5 M NaCl	H <sub>2</sub> O ad 100 $\mu\text{l}$
0	50 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
5	50 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	39 $\mu\text{l}$
10	50 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	38 $\mu\text{l}$
20	50 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	36 $\mu\text{l}$
30	50 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$	34 $\mu\text{l}$
50	50 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$
100	50 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
150	50 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$

- **20x RB<sup>-/-</sup>:** 200 mM Tris pH 7,8, 200 mM  $\text{MgCl}_2$



# Kapitel 3

## Methoden

### 3.1 Molekularbiologische DNA-Methoden

#### 3.1.1 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA wurden 100 mg Gewebe oder  $1 \times 10^7$  Zellen in einem Eppendorf-Gefäß mit 500  $\mu$ l Lyse-Puffer (50 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SDS) und 25  $\mu$ l Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht bei 55 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 200  $\mu$ l 6 M NaCl zugegeben und die Lösung 5 Minuten auf einem Eppendorf-Mixer geschüttelt. Durch eine anschließende Zentrifugation für 7 Minuten bei 13 000 rpm (Biofuge 13, Heraeus) wurden Proteine aus der Lösung gefällt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zusatz von 500  $\mu$ l Isopropanol wurde die genomische DNA bei 13 000 rpm (Biofuge 13, Heraeus) innerhalb von 15 Minuten pelletiert, das Pellet getrocknet und je nach Größe in 250-400  $\mu$ l TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) bei 37 °C (3 Stunden oder über Nacht) gelöst.

#### 3.1.2 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Einzelne Bakterienklone wurden mit gelben Pipettenspitzen von der Agarplatte gepickt und über Nacht in einem Wassermann-Röhrchen mit 2 ml Selektionsmedium (TY-Medium mit Antibiotikum) bei 37 °C im Bakterienschüttler kultiviert. Am nächsten Morgen wur-

den die Bakterien aus der Minikultur in Eppendorf-Gefäße überführt und diese 1 Minute bei 10 000 rpm (Biofuge 13, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Bakterienpellet in 100  $\mu$ l Puffer 1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100  $\mu$ g/ml RNase A) resuspendiert. Nachdem die Bakterien ausreichend resuspendiert waren, wurden 100  $\mu$ l Puffer 2 (200 mM NaOH; 1% SDS) zugegeben, die Eppendorf-Gefäße 5-6mal invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Puffer 3 (3 M KAc pH 5,5) hinzupipettiert, die Eppendorf-Gefäße erneut 5-6mal invertiert und dann 10 Minuten bei 13 000 rpm (Biofuge 13, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und durch Zugabe von 750  $\mu$ l 100% Ethanol (-20 °C) und Zentrifugation für 15 Minuten bei 13 000 rpm (Biofuge 13, Heraeus) gefällt. Das Pellet wurde mit 200  $\mu$ l 75% Ethanol (-20 °C) gewaschen, getrocknet und in 30  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **3.1.3 Plasmidpräparation im großen Maßstab (Maxipräparation mit Promega-Kit)**

Die Maxi-Übernachtskultur wurde bei 6 000 rpm (Zentrifuge J2-HS, Rotor JA-14, Beckman) 10 Minuten bei Raumtemperatur in einem Kunststoff-Gefäß abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 6 ml Resuspensions-Puffer (50 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml RNase A) gut resuspendiert. Die Bakterien im resuspendierten Pellet wurden mit 6 ml Lyse-Puffer (0,2 M NaOH, 1% SDS) 4-6mal invertiert und 5 Minuten bei RT lysiert. Nach Ablauf der 5-minütigen Inkubationszeit wurden 10 ml Neutralisierungs-Puffer (4,09 M Guanidinhydrochlorid pH 4,8, 759 mM Kaliumacetat, 2,12M Eisessig) hinzugefügt, die Lösungen sofort gemischt und anschließend durch 30-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 10 000 rpm (Zentrifuge J2-HS, Rotor JA-14, Beckman) die Bakterienbruchstücke pelletiert. Der Überstand wurde durch Anlegen eines Vakuums durch zwei Filtersäulen gesaugt, wobei die erste der Filterung größerer Membranbruchstücke diene. An die zweite Säule band anschließend die Plasmid-DNA. Die Säule wurde gewaschen, um Endotoxine und andere Verunreinigungen der Plasmid-

DNA zu entfernen (Waschpuffer: 162,8 mM Kaliumazetat, 22,6 mM Tris (pH 7,5), 0,109 mM EDTA). Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 600  $\mu$ l destilliertes Wasser auf die Säule gegeben, diese auf ein 50 ml-*Falcon*-Röhrchen gesetzt und bei 2000 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus) 5 Minuten zentrifugiert.

### 3.1.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen zur Analyse von klonierter DNA wurden unter den von den Herstellerfirmen angegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Um 1  $\mu$ g Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen zu schneiden, wurde die DNA mit der zwei- bis fünffachen Enzymmenge (2-5 U) für 1-2 Stunden in der entsprechenden Verdünnung der Restriktionspuffer inkubiert. Die Inkubationstemperatur richtete sich dabei nach dem angegebenen Wirkoptimum der Restriktionsenzyme.

### 3.1.5 Dephosphorylierung von DNA

Um die Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern, wurde nach beendetem Restriktionsverdau des Vektors dem Ansatz 1/10 Volumen 10x Dephosphorylierungspuffer und 1  $\mu$ l 1 U/ $\mu$ l Alkalische Phosphatase zugegeben. Die Reaktion wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Vektor-DNA über ein Agarosegel aufgereinigt, extrahiert (s. Abschnitt 3.1.12) und für die Ligation verwendet (s. Abschnitt 3.1.7).

### 3.1.6 Auffüllen von 5'-Überhängen

Für das Auffüllen von 5'-Überhängen wurde die DNA nach dem Restriktionsverdau gefällt und das Pellet getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 1/10 Volumen 10x Polymerase-Puffer, 2  $\mu$ l Klenow-Polymerase (1 U/ $\mu$ l und 2  $\mu$ l dNTPs (2,5 mM) im 20  $\mu$ l-Ansatz für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

### 3.1.7 Ligation von DNA

Für eine Ligation eines Vektors mit einem Fragment wurde der folgende Ansatz vorbereitet: 50 ng Vektor, 100-200 ng Fragment, 1/10 Volumen 10x Ligase-Puffer, 1/10 Volumen PEG 4000 und 1-2 U T4-DNA-Ligase. Die Volumina für Vektor und Fragment müssen der Konzentration in der Ausgangslösung entsprechend angepasst werden. Der Ansatz wurde 2-4 Stunden bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

### 3.1.8 Herstellung chemo-kompetenter *E. coli*-Bakterien

100 ml TY-Medium ( ) wurde mit dem Bakterienstamm *XL-1 blue* angeimpft und unter Schütteln bei 180 rpm und 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,48 inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in zwei sterile 50 ml-Röhrchen überführt und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (3 000 rpm; 10 Min., 4 °C, Varifuge 3.0R, Heraeus) wurden die *Pellets* in eiskalter Lösung I (100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM KAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin; pH 5,8) resuspendiert und für 3 Stunden auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3 000 rpm, 10 Min., 4 °C, Varifuge 3.0R, Heraeus) wurde der Überstand verworfen und die Bakterien in 10 ml eisgekühlter Lösung II (10 mM MOPS, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin; pH 7) resuspendiert. 100 µl Aliquots wurden angefertigt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.1.9 Transformation chemo-kompetenter *E. coli*-Bakterien

Ein Aliquot chemokompetenter *E. coli*-Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden mit 10 µl Ligationsansatz gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42 °C. Anschließend wurde der Bakterien/DNA-Mix kurz auf Eis abgekühlt und dann 500 µl TY-Medium zugegeben. Die Bakterien wurden nun 30 Minuten bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert und anschließend auf Selektions-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 3.1.10 Klonierung des Konstruktes hTaps(D212N)

Zur Generierung einer dominant-negativen Mutante von hTaps (hTaps(D212N)) wurde durch die Wahl geeigneter Oligonukleotide (s. Tab. 2.2) in einer PCR-Reaktion mit dem Vektor pBSK-hTaps (von J. Hess zur Verfügung gestellt) zwei Basen im DSG-Motiv der Taps-Sequenz so ausgetauscht. Dieses PCR-amplifizierte Fragment wurde mit *Stu*I und *Apa*I verdaut und das Fragment aufgereinigt. Das pBSK-Taps-Plasmid wurde ebenfalls mit *Stu*I und *Apa*I linearisiert und das aufgereinigte, mutierte Taps-Fragment in den linearisierten Vektor ligiert. Die Mutation wurde durch eine Sequenzierung kontrolliert. Anschließend wurde das pBSK-Taps(D212N)-Plasmid mit *Xho*I und *Hind*III verdaut und das erhaltene Taps(D212N)-Fragment in einen mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelten pcDNA3.1(+)-C-Vektor ligiert.

### 3.1.11 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Für die Gelelektrophorese von DNA wurde für ein 1%iges Gel in einem Erlenmeyerkolben 0.5 g Agarose mit 50 ml 1x TBE- Puffer (1 mM Tris, 1 mM Borsäure, 2 mM EDTA) in der Mikrowelle aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurden 2  $\mu$ l Ethidiumbromid hinzupipettiert und die Lösung durch Schwenken des Kolbens gut gemischt. Die Agarose-Lösung wurde in eine Elektrophorese-Kammer gegossen und ein passender Kamm eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose-Lösung wurde das Gel vollständig mit 1x TBE-Puffer als Laufpuffer überschichtet und der Kamm herausgezogen. In die Aussparungen, die durch die Zähne des Kammes gebildet wurden, konnte die mit 10x-DNA-Ladepuffer (50% Glyzerin, 0,2% Xylencyanol, 0,2% Bromphenolblau, 40 mM EDTA) versetzte DNA-Probe pipettiert werden. Die Aussparungen fassen 25  $\mu$ l. Anschließend wurden die Elektroden der Spannungsquelle angeschlossen, die Kathode auf Höhe der Geltaschen, die Anode am entgegengesetzten Ende des Gels. Die Elektrophorese fand bei 100-120 V statt.

### 3.1.12 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit Protokoll

Die gewünschte DNA-Bande wurde auf einem UV-Leuchttisch aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gewogen. Das Gelstück wurde in einem Eppendorf-Gefäß mit 3 Volumen Puffer QG ( ) auf 1 Volumen Gel ( $100 \text{ mg} = 100 \mu\text{l}$ ) bei  $50^\circ\text{C}$  gelöst. Pro Volumen des Gelstückes konnte 1 Volumen Isopropanol zugesetzt werden, was die Aufreinigungseffizienz bei Fragmenten, die kleiner als 500 bp oder größer als 4 kb sind, erhöht. Nun wurde eine QIAquick-Säule auf ein Sammelröhrchen gesetzt, die Probe geladen und zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte in diesem Protokoll erfolgten bei 13 000 rpm, 1 Minute (Biofuge 13, Heraeus). Die QIAquick-Säule fasst ein Volumen von höchstens  $800 \mu\text{l}$ , so dass größere Volumina evtl. in zwei Schritten auf die Säule geladen werden mussten. Der Durchfluß wurde verworfen. Zum Waschen der Säule wurden 0.5 ml Puffer QG auf die Säule geladen und diese wieder zentrifugiert. Anschließend wurden 0,75 ml Puffer PE ( ) auf die Säule geladen, diese 5 Minuten bei RT stehen gelassen und schließlich zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule erneut zentrifugiert, um etwaige Reste des ethanolischen Puffers zu entfernen. Nun wurde die Säule auf ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß gesetzt,  $30 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  direkt auf die Membran pipettiert und bei RT eine Minute inkubiert. Durch die nachfolgende Zentrifugation wurde die DNA aus der Säule eluiert und kann bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

### 3.1.13 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA bzw. RNA

Durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion werden Nukleinsäure-Lösungen von Verunreinigungen durch Proteine gereinigt. Die zu reinigende Nukleinsäure liegt in einer wässrigen Lösung vor, deren Volumen bekannt ist. Im ersten Schritt wurde diese wässrige Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol (Tris-gepuffert für DNA-Extraktion,  $\text{H}_2\text{O}$ -gepuffert für RNA-Extraktion) gemischt, gut gevortext und 10 Minuten bei 13 000 rpm (Biofuge 13, Heraeus) zentrifugiert. Dabei trennen sich wässrige und organische Phase wieder. In der Interphase befanden sich nun die Proteine. Die obere wässrige Phase wurde nun in ein

neues Eppendorf-Gefäß überführt, wobei keine Interphase sowie keine organische Phase verschleppt werden durfte. Die wässrige Phase wurde nun mit einem gleichen Volumen Chloroform gemischt, wieder gut gevortext und 2 Minuten bei 13 000 rpm (Biofuge 13, Heraeus) zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut in ein frisches Eppendorf-Gefäß transferiert und mit gleichem Volumen Chloroform gemischt, gevortext und zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige obere Phase wieder in ein frisches Eppendorf-Gefäß pipettiert. Bei diesem Schritt durfte kein Chloroform verschleppt werden, da dieses spätere enzymatische Reaktionen hemmen könnte.

### 3.1.14 Ethanolpräzipitation

Die Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgt durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat- Lösung, pH 5,3 und 2,5 Volumen 100% Ethanol. Die Fällung kann durch Lagerung der Probe bei -20 °C verbessert werden.

### 3.1.15 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration in Lösung

RNA wird in der Fällungsreaktion bei -20°C gelagert. Für die Konzentrationsbestimmung wurde die RNA-Suspension sehr gut gevortext, ein Aliquot in ein neues Eppendorfgefäß überführt und durch Zentrifugation (15 Minuten, 13 000 rpm, Biofuge13, Heraeus) gefällt. Das Ethanol wurde abgenommen, das *Pellet* kurz getrocknet und in 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst. DNA wird in wässriger Lösung gelagert. Hier konnte direkt ein Aliquot entnommen, auf 500  $\mu$ l aufgefüllt und die Konzentration durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm im Abgleich gegen das verwendete Lösungsmittel bestimmt werden. Im Allgemeinen gilt:

für doppelsträngige DNA:  $OD_{260} = 1$  entspricht einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml in einer unverdünnten Lösung,

für RNA:  $OD_{260} = 1$  entspricht einer Konzentration von 40  $\mu$ g/ml,

für einzelsträngige Oligonukleotide:  $OD_{260} = 1$  entspricht einer Konzentration von 33

$\mu\text{g/ml}$ .

Eine Kontamination mit Proteinen (Absorptionsmaximum bei 280 nm) lässt sich durch Erstellen des Quotienten  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  erkennen. Reine DNA bzw. RNA ist durch einen Quotienten von 1,8-2,0 charakterisiert.

### 3.1.16 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine Standard-Reaktion zur Amplifikation von DNA wurde unter den folgenden Bedingungen in einem *Thermo-Cycler* durchgeführt: 1/10 Volumen 10x Taq-Puffer (Steinbrenner Laborsysteme) bzw. 10x GB-Puffer (166 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 670 mM Tris pH 8,8, 67 mM  $\text{MgCl}_2$ , 67  $\mu\text{M}$  EDTA, 54 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol), 1/10 Volumen 10x dNTP-Lösung, je 1/10 Volumen 10x Oligonukleotide (2,5 mM), 1-2 U Taq-Polymerase und 10-500 ng Matrizen-DNA wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf das entsprechende Gesamtvolumen (meist 20 bzw. 25  $\mu\text{l}$ ) aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94 °C für 1 Minute, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Oligonukleotide optimalen Temperatur und die DNA-Synthese bei 72 °C (Taq-Puffer) bzw. 65 °C (GB-Puffer) für 0,5-1,5 Minuten abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Produktes.

### 3.1.17 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR wurde im *MyIQ Real-Time PCR*-Detektionssystem durchgeführt. 12,5  $\mu\text{l}$  der *SYBR Green*-Lösung wurde mit jeweils 0,4  $\mu\text{M}$  Oligonukleotiden und der zu bestimmenden cDNA gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 25  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen aufgefüllt. Vor den Amplifikationszyklen wurde die in der *SYBR Green*-Lösung enthaltene *Hot Start*-Taq-Polymerase durch Erhitzen auf 95 °C für 15 Minuten aktiviert. Die Temperaturbedingungen richteten sich nach den zuvor in der Standard-PCR etablierten Temperaturoptima der verwendeten Oligonukleotide. Die Synthesetemperatur betrug 72 °C. Die DNA-Fragmente wurden in 45 Zyklen amplifiziert und der Verlauf der Reaktion mit dem Programm *MyIQ* verfolgt und aufgezeichnet. Zum Abgleich der eingesetzten cDNA



wurden die Mengen an cDNA in einer HPRT-PCR und in der PCR des zu bestimmten Zielgens verglichen. Über den Vergleich der Amplifikationszyklen bei denen ein zuvor festgelegter Schwellenwert erreicht wurde, konnte das Verhältnis von HPRT zum Zielgen bestimmt werden.

### 3.1.18 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren [110] unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten dNTPs aus dem *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit* der Firma GE Healthcare (Amersham). In einem 20  $\mu$ l-Ansatz wurden 800 ng Plasmid-DNA mit 10 pmol Primer und 2  $\mu$ l Sequenzierungs-Premix gemischt. In einem Thermo-Cycler wurde mit diesem Ansatz folgendes Programm durchlaufen: [96 °C, 20 Sekunden; 55 °C, 15 Sekunden; 60 °C, 1 Minute] x 25. Zur Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte wurde der Ansatz mit Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 20  $\mu$ l Formamid aufgenommen, 3 Minuten auf 90 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und im *AbiPrism 310 Genetic Analyser* analysiert.

## 3.2 Molekularbiologische RNA-Methoden

### 3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der RNA aus Geweben und Zellen erfolgte mit *peqGOLD RNAPure*<sup>TM</sup>.

#### Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben

50-100 mg Gewebe wurden mit je 1 ml *peqGOLD RNAPure*<sup>TM</sup> homogenisiert. Eine gute Lyse wurde durch Verwendung eines *Ultra-Turrax*-Homogenisators T25 (Ika Labortechnik) erreicht.

Die Proben blieben für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen, um eine Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Je eingesetztem Milliliter *peqGOLD RNAPure*<sup>TM</sup> wurden 0.2 ml Chloroform (frei von Zusätzen wie z.B. Isoamylalkohol) zugegeben und die

Proben 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Anschließend sollten die Proben 3-10 Minuten bei Raumtemperatur stehen, gefolgt von einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 13 000 rpm (Biofuge 13, Heraeus). Hierdurch wurde eine Trennung der Probe in drei Phasen erreicht: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA befand sich in der wässrigen Phase, während DNA und Proteine sich in der Interphase und der Phenolphase anreicherten. Die wässrige Phase nahm ca. 60% des Probenvolumens ein.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und die RNA mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem Milliliter *peqGOLD RNAPure*<sup>TM</sup> präzipitiert. Die Proben wurden 5-15 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und anschließend für 10 Minuten bei 13 000 rpm und 4°C (Zentrifuge 5403, Eppendorf) zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat hatte eine gelartige Konsistenz und befand sich an der unteren Seite des Röhrchens.

Der Isopropanol-Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet zweimal mit 1 ml 75% Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (10 Minuten, 13 000 rpm, 4°C, Zentrifuge 5403, Eppendorf) gewaschen.

Das RNA-Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette in autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Adhärenent wachsende Zellen wurden direkt in der 10 cm-Kulturschale durch Zugabe von 2 ml *peqGOLD RNAPure*<sup>TM</sup> und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert.

Die darauffolgenden Schritte (Dissoziation der Nukleotidkomplexe, Phasentrennung, Präzipitation, sowie Fällung und Lösen in Wasser) entsprachen denen bei der Isolierung von RNA aus Geweben (s. Abschnitt 3.2.1)

#### 3.2.2 Synthese von cDNA

2-3  $\mu$ g total RNA wurden gefällt und das Pellet getrocknet, anschließend mit 0,2  $\mu$ l oligo(dT)(500 ng/1  $\mu$ g RNA) und 14,8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O 5 Minuten bei 70 °C inkubiert, dann 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 5  $\mu$ l 5x AMV RT-Puffer, 1  $\mu$ l 25 mM dNTP-Mix, 1  $\mu$ l

RNAasin und 3  $\mu\text{l}$  AMV RT (10 U/ $\mu\text{l}$ ) lief die Reaktion der cDNA- Synthese in 1 Stunde bei 42 °C ab.

### 3.2.3 Elektrophorese von RNA

Der Agarose-Flachbettschlitten wurde an den Enden mit Isolierband abgeklebt und der Kamm in die vorgesehenen Aussparungen gesteckt. 1 g Agarose wurde mit 76 ml  $\text{H}_2\text{O}$  in einem Erlenmeyer-Kolben in der Mikrowelle aufgekocht. Die Lösung musste auf ca. 65°C abkühlen, bevor 5 ml 20x MOPS (400 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 100 mM Natriumacetat-Trihydrat (NaOAc), 10 mM EDTA) und 18 ml Formaldehyd hinzupipettiert werden. Die Lösung wurde in den Flachbettschlitten gegossen und erkaltet. Das Gel wurde in die Elektrophorese-Apparatur überführt und mit 1x MOPS- Puffer überschichtet. Unter Puffer wurde der Kamm aus dem Gel gezogen.

Die RNA/Ethanol-Suspension wurde gut gevortext, eine Volumenmenge entnommen, die der gewünschten RNA-Menge entspricht und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die RNA-Suspension wurde 10 Minuten bei 13 000 rpm (Biofuge, Heraeus) zentrifugiert und das Ethanol mit einer Pipette vorsichtig entfernt. Das RNA-Pellet wurde mit 100  $\mu\text{l}$  70% Ethanol gewaschen, der Überstand komplett abgenommen und das Pellet für ca. 10 Minuten getrocknet. Das getrocknete RNA-Pellet wurde in 20  $\mu\text{l}$  Probenpuffer-Mix (10  $\mu\text{l}$  Formamid, 3,5  $\mu\text{l}$  Formaldehyd, 1  $\mu\text{l}$  20x MOPS, 5,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ) gelöst.

Die RNA wurde im Probenpuffer bei 56°C für 15 Minuten hitzedenaturiert. Anschließend wurden 2  $\mu\text{l}$  10x- Farbmarker (50% Glyzerin, 0,2% Xylencyanol, 0,2% Bromphenolblau, 40 mM EDTA) zugegeben und 20  $\mu\text{l}$  in die Taschen des Gels pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung konnte über Nacht bei 20 V durchgeführt werden, wobei der Puffer durch eine peristaltische Pumpe umgewälzt wurde (von + nach -), oder tagsüber bei ca. 110 V.

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel in eine Schale mit  $\text{H}_2\text{O}$  überführt und für 15 Minuten gewässert. Anschließend wurde das Gel in Ethidiumbromid-Lösung trans-

feriert und 10 Minuten gefärbt. Nach Ablauf der 10 Minuten wurde das Gel wieder in eine Schale mit  $H_2O$  gelegt und entfärbt (3 x 10 Minuten). Das Gel konnte nun auf einem UV-Tisch mit Längenstandard (Lineal) photographiert werden.

### 3.2.4 Northern Blot

Northern Blot bezeichnet den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennter RNA aus einem RNA-Gel auf eine Membran.

Für den Transfer wurde folgender Versuchsaufbau gewählt: Auf eine Kunststoffschale wurde eine Glasplatte gelegt. Auf diese Glasscheibe wurden zwei Stücke *3MM Whatman*-Filterpapier gelegt, so dass die Enden in den 10x SSC-Puffer (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-Zitrat) in der darunterstehenden Schale reichen. Auf diese beiden Stücke Filterpapier wurden 3 weitere Stücke Filterpapier gelegt, die mit 10x SSC-Puffer getränkt und mit einem Glasstab glatt gestrichen wurden. Darauf wurde das Gel so gelegt, dass die Seite des Gels, die in der Elektrophorese-Kammer mit Puffer bedeckt war, nach unten auf die Filterpapiere zu liegen kam. Auf das Gel wurde ein Stück *Hybond N+* Northern Blot-Membran gelegt, das nur wenig größer als das Gel zugeschnitten war. Die Membran wurde auf dem Gel glatt gestrichen, so dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befanden. Auf die Membran wurden 3 weitere Stücke Filterpapier gelegt, ebenfalls geglättet und mit einem Stapel Papierhandtücher bedeckt. Auf die Papierhandtücher wurde eine Schale mit einer gefüllten Glasflasche gestellt, um den Blotaufbau zu beschweren.

Der Transfer der RNA aus dem Gel auf die Membran benötigt einige Stunden, weshalb am über Nacht geblottet wurde. Am nächsten Tag konnte der Blot vorsichtig abgebaut werden, die Membran wurde beschriftet und die Positionen der Geltaschen auf der Membran markiert. Die Membran wurde auf einem Papiertuch getrocknet und in einem UV-Gerät bestrahlt. Dadurch wurde die RNA auf der Membran fixiert, so dass sie auch durch anschließende Inkubations- und Wasch-Schritte nicht abgewaschen werden konnte.

Für den Nachweis einer spezifischen mRNA auf einem *Northern Blot* wurde ein DNA-Fragment isoliert, das die Sequenz für die nachzuweisende mRNA enthält. Das Fragment wurde in 45  $\mu$ l Endvolumen mit dd $H_2O$  aufgenommen, 5 Minuten aufgekocht und 2 Minu-

ten auf Eis abgekühlt. Die Probe wurde gemäß den Angaben des Herstellers mit Hilfe des *rediprime*<sup>TM</sup> II-Kits (Fa. Amersham Pharmacia) radioaktiv markiert und anschließend über NucTrap<sup>®</sup> Probe Purification Columns der Firma Stratagene aufgereinigt. Hierzu wurden die Säulen mit 70  $\mu$ l 1x TNE-Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) äquiliibriert, dann die 50  $\mu$ l Probe + 20  $\mu$ l 1x TNE-Puffer aufgetragen und durch die Säule in ein Eppendorf-Gefäß gedrückt. Die Säule wurde mit 70  $\mu$ l 1x TNE-Puffer nachgewaschen, so dass sich zum Schluss insgesamt 100-140  $\mu$ l Probe im Eppendorf-Gefäß befanden. Die markierte Probe wurde erneut 5 Minuten aufgekocht und kann dann zusammen mit 10 ml Hybridisierungslösung (7% SDS, 0,5 M Phosphatpuffer, 1 mM EDTA) zu der prähybridisierten *Northern Blot*-Membran in eine Glasröhre gegeben werden, in der die Membran im Hybridisierungssofen während der Hybridisierung bewegt wurde.

Zur Prähybridisierung der Membran wurde diese in einer Glasröhre ca. 1 Stunde bei 65°C mit 10 ml Hybridisierungslösung im Hybridisierungssofen inkubiert.

Die Hybridisierung der Membran mit der radioaktiv markierten Probe erfolgte über Nacht bei 65°C.

Am nächsten Tag wurde die Membran einmal 15 Minuten mit Waschlösung 1 (40 mM Phosphatpuffer, 1 mM EDTA, 5% SDS) und dreimal mit Waschlösung 2 (40 mM Phosphatpuffer, 1 mM EDTA, 1% SDS) bei 65°C gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie gepackt; es konnte eine Phosphoimager-Platte oder ein Röntgenfilm aufgelegt werden. Beim Auflegen eines Filmes sollten Verstärkerfolien hinter die Membran und hinter den Film gelegt und die Filmkassette bei -80°C gelagert werden.

## 3.3 Proteinbiochemische Methoden

### 3.3.1 Herstellung von Gesamt-Proteinextrakten

#### Gesamtproteinextrakte aus Geweben

Ein Gewebestück von ca. 100 mg wurde mit 2 ml kaltem RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% Deoxycholsäure Na<sup>+</sup>-Salz, 1% NP-40) in einem

Rundboden-Röhrchen mit Hilfe des *Ultra-Turrax* homogenisiert. Das Homogenisat wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend auf zwei 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße verteilt und 10 Minuten bei 15000 rpm in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C (Zentrifuge 5403, Eppendorf) abzentrifugiert, um Membranbestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Ein 5 µl-Aliquot wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration abgenommen, der Rest auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### Gesamtproteinextrakte aus Zellen

Die Zellen wurden auf der Platte zweimal mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Mit einem Gummischaaber wurden die Zellen anschließend von der Zellkulturschale abgeschabt und mit 1 ml PBS<sup>-/-</sup> in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 4 000 rpm und 4 °C (Zentrifuge 5403, Eppendorf) pelletiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 2-3 Volumen (meist 100 µl) RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% Deoxycholsäure Na<sup>+</sup>-Salz, 1% NP-40)- oder PP100 (25 mM Tris-HCl pH 7,8, 5 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% Glycerin, 0,1% NP-40)-Puffer (4 °C) lysiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der Extrakt wurde 10 Minuten bei 4 °C und 15 000 rpm (Zentrifuge, 5403, Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert. Ein 5 µl-Aliquot wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration abgenommen, der Rest auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.3.2 Herstellung von Kern- und Zytoplasmaextrakten

Für die Präparation von Kern- und Zytoplasmaextrakten wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und in ca. 1 ml PBS<sup>-/-</sup> abgeschabt. Die Zellen wurden in Eppendorf-Gefäße überführt und in einer Kühlzentrifuge (5 Minuten, 4 000 rpm, 4°C, Zentrifuge 5403, Eppendorf) pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl CE(+)-Puffer (10 mM HEPES KOH pH 7,9, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) resuspendiert. Durch die darauffolgende Inkubation auf Eis (5 Minuten) wurden die Zellmembranen aufgebrochen. Die Kerne wurden dann bei 3 000 rpm, 4°C

(Zentrifuge 5403, Eppendorf) für 5 Minuten abzentrifugiert.

a) Der nun erhaltenen Überstand, der zytosolische Extrakt wurde mit 50  $\mu$ l NE-Puffer (250 mM Tris pH 7,8, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) versetzt, 15 Minuten bei 12 000 rpm (Zentrifuge 5403, Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

b) Das Pellet (die Kerne) wurden mit 250  $\mu$ l CE(-)-Puffer (10 mM HEPES KOH pH 7,9, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) vorsichtig gewaschen und erneut durch Zentrifugation (5 Minuten, 3 000 rpm, 4 °C, Zentrifuge 5403, Eppendorf) pelletiert. Das Pellet wurde in 60  $\mu$ l NE-Puffer resuspendiert. Die Unversehrtheit der Kerne wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Es folgten drei Gefrier-Tau-Zyklen, um die Kernmembranen aufzubrechen. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 12 000 rpm und 4 °C (Zentrifuge 5403, Eppendorf) zentrifugiert und der erhaltenen Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

### 3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Benötigte Lösungen:

- Lowry-I: 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0,1 N NaOH = 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 2 g NaOH in 500 ml ddH<sub>2</sub>O
- Lowry-II: 2% Na-K-Tartrat = 2 g Na-K-Tartrat in 100 ml ddH<sub>2</sub>O
- Lowry-III: 1%  $\text{CuSO}_4$  = 1 g  $\text{CuSO}_4$  in 100 ml ddH<sub>2</sub>O
- Lowry-IV: 100  $\mu$ l Lowry-II + 10 ml Lowry-I mischen, + 100  $\mu$ l Lowry-III, immer frisch ansetzen

Für die klassische Proteinbestimmung nach Lowry [80] wurde eine BSA-Eichkurve angelegt:

0,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0	60,0	$\mu$ l BSA (1mg/ml)
5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	$\mu$ l Extraktions-Puffer
145,0	140,0	135,0	125,0	115,0	105,0	85,0	$\mu$ l Lowry-I
250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	$\mu$ l Lowry-IV

Gut mischen und 5 Minuten bei RT inkubieren.

In jedes Eppendorf-Gefäß 30  $\mu$ l Folin-Reagenz (1:1 verdünnt mit Wasser) pipettieren, wieder gut mischen und 30-90 Minuten bei RT im Dunkeln inkubieren.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in Proteinextrakten wurden 5  $\mu$ l Proteinextrakt gemischt mit 145  $\mu$ l Lowry-I, 250  $\mu$ l Lowry-IV und 30  $\mu$ l 50% Folinreagenz. Diese Proben wurden ebenfalls gut gemischt und bei RT 30-90 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut gemischt und je 100  $\mu$ l Lowry-Reaktion in eine Mikrotiterplatte pipettiert und im ELISA-Reader bei 600 nm gemessen.

Die Proteinkonzentration der Proteinextrakte konnte dann anhand der erstellten BSA-Eichkurve berechnet werden.

### 3.3.4 Ionenaffinitätschromatische Aufreinigung von Proteinen mit Talonbeads

Zuerst wurden die *Talonbeads* (Talon Metal Affinity Resin, BD Biosciences Clontech) prä-äquilibriert. Hierzu wurden 100  $\mu$ l *Talonbeads* pro aufzureinigende Probe in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen pipettiert. Die *Talonbeads* wurden zweimal mit 10 ml kaltem PBS<sup>-/-</sup> bzw. Proteinextraktionspuffer gewaschen und anschließend 5 Minuten bei 4 000 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus) zentrifugiert. Die *Talonbeads* wurden in 1 ml PBS<sup>-/-</sup> bzw. 100  $\mu$ l Extraktionspuffer pro aufzureinigende Probe resuspendiert und gleiche Mengen auf so viele 15 ml-Röhrchen/Eppendorf-Gefäße verteilt wie Aufreinigungen vorgesehen sind. Die *Beads* wurden noch einmal abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nun wurde der Zellkultur-Überstand abzentrifugiert (4 000 rpm, 5 Minuten, Varifuge 3.0R, Heraeus), um tote Zellen und Zellbruchstücke aus dem Medium zu entfernen. Der



Überstand/Proteinextrakt wurde dann mit den *Talonbeads* vereinigt und 2 Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die *Beads* abzentrifugiert, dreimal mit kaltem PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und der Überstand gründlich entfernt. Anschließend wurden die *Talonbeads* in 50 µl 2x Lämmli-Puffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, Bromphenolblau) mit 2% β-Mercaptoethanol resuspendiert, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit einer sogenannten SDS-PAGE, der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli ([73]). Ein SDS-Gel besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Die Prozentangabe bezieht sich hierbei immer auf den Polyacrylamid-Anteil des Trenngels und richtete sich nach dem Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins. Das Trenngel (Trenngel-Lösung: 6-15% Acrylamid/Bisacrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,05% TEMED) sollte zwischen den beiden verwendeten Glasplatten ca. 2/3 des Volumens einnehmen. Sobald das Trenngel die erforderliche Höhe (bis ca. 4 cm unterhalb des obereren Randes) erreicht hatte, wurde es mit 70% Ethanol überschichtet (ca. 1 ml). Dadurch wurden Luftblasen entfernt und das Gel konnte mit einer glatten Oberfläche polymerisieren.

Sobald das Gel vollständig polymerisiert war, konnte das Sammelgel (Sammelgel-Lösung: 4% Acrylamid/Bisacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED) gegossen und ein Kamm eingesetzt werden. Die durch den Kamm gebildeten Taschen fassten ein Volumen von ca. 80 µl bei den meist verwendeten großen Glasplatten und ein Volumen von ca. 20 µl bei sogenannten Minigelen.

Die mit Lämmli-Puffer versetzten Proteinproben wurden nach dem Aufkochen (5 Minuten, 95°C) in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels pipettiert. Als Laufpuffer für die Gelelektrophorese diente 1x SDS-Laufpuffer (250 mM Tris-base, 1,92 M Glyzin, 1% SDS). Der Sammelgellauf erfolgte üblicherweise bei konstanten 26 mA und die Länge des sich anschließenden Trenngellaufes bei 26-36 mA richtete sich nach Größe und gewünschter Auftrennung der zu analysierenden Proteine.

### 3.3.6 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot)

Der Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine aus auf eine Nitrozellulose-Membran *Optitran BA-S 83* erfolgte mittels einer *semi-dry Western Blot*-Apparatur. Hierfür wurden in der Blot-Apparatur 3 Stücke *Whatman 3MM*-Papier, die Nitrozellulose-Membran, das Trenngel und 3 weitere Stücke *Whatman 3MM*-Papier in 1x *Western-Transferpuffer* (25 mM Tris-base, 190 mM Glyzin, 20% Methanol) getränkt und luftblasenfrei aufeinander gelegt. Der Transfer erfolgte bei RT und konstanten 18 V für 1-2 Stunden. Die Übertragung der Proteine auf die Membran wurde mit einer *Ponceau S*-Färbung überprüft. Anschließend wurde die Membran 30 Minuten bei RT mit 7.5% Milchpulver in PBS<sup>-/-</sup> mit 0,5% Tween20 inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran mit Protein abzusättigen. Danach konnte die Membran mit einem entsprechenden Erstantikörper (1:1000 anti-Myc; 1:250 anti-Caspase-14; 1:100 anti-Taps; 1:500 anti-E-cadherin; 1:500 anti- $\beta$ -Aktin, anti- $\beta$ -catenin 1:500) inkubiert werden, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet war. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei RT oder bei 4°C über Nacht. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS/0,5% Tween20 für 10 Minuten entfernt. Es folgte eine einstündige Inkubation mit einem gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper (1:2000 anti-Maus; 1:2500 anti-Kaninchen; 1:5000 anti-Ziege), der an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Auch nach dieser Inkubation wurde durch Waschen mit PBS<sup>-/-</sup>/0,5% Tween20 unspezifisch gebundener Antikörper entfernt.

Für den Nachweis der gebundenen Antikörper wurde die Membran 1 Minute mit ECL-Lösung bedeckt, anschließend in Frischhaltefolie gepackt und in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition des Films richtete sich nach der Intensität des Signals.

### 3.3.7 DNA-Proteinbindungsanalyse

Bei dieser Methode, auch *Electromobility Shift Assay* (EMSA) genannt, bewirkt die Bindung eines Transkriptionsfaktors an radioaktiv markierte Oligonukleotidsonden eine Verlangsamung der Wanderung der Komplexe in einem Polyacrylamid-Gel im Vergleich zur ungebundenen Sonde. Dadurch können im Autoradiogramm Banden oberhalb der ungebundenen Sonden nachgewiesen werden. Zur Identifizierung der Proteine, die an die Sonden gebunden haben, können spezifische Antikörper gegen Transkriptionsfaktoren eingesetzt werden, die die Bildung der Protein/DNA-Komplexe verhindern oder eine weitere Verlangsamung des Komplexes bewirken (*Supershift*).

Für die Reaktion, in der aus zwei komplementären Oligonukleotiden eine doppelsträngige Sonde entsteht, wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  der beiden Oligonukleotide mit 20  $\mu\text{l}$  1x TE-Puffer (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA) gemischt, das Gemisch 5 Minuten im Wasserbad aufgekocht, in ein zweites Wasserbad überführt, das auf 65°C vorgeheizt wurde und darin auf RT abgekühlt. Für die radioaktive Markierung der Oligonukleotidsonden wurden die doppelsträngigen Sonden in einer Endkonzentration von 1 pmol/ $\mu\text{l}$  mit 1/10 Volumen 10x Polymerase-Puffer, 1/10 Volumen  $^{32}\text{P}$ -dCTP, 1/20 Volumen dATG (jeweils 5 mM) und 1/20 Volumen Klenow (5 U/ $\mu\text{l}$ ) in einem Gesamtansatz von 20  $\mu\text{l}$  versetzt und 30 Minuten bei RT inkubiert. Die radioaktiv markierten Sonden werden über *NucTrap*<sup>®</sup>-Säulen aufgereinigt und die Stärke der radioaktiven Markierung in einem Szintillationszähler bestimmt.

Für die Proteinbindungsanalyse wurden 2  $\mu\text{g}$  Kernextrakt mit 1/10 Volumen 10x Puffer, 1/20 Volumen polydI/dC (unspezifische Kompetitions-DNA), 1/10 Volumen BSA und 1/10 Volumen der markierten Sonde in 20  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen für 30 Minuten bei RT inkubiert. Für einen *Supershift* wurden die Kernextrakte vor der Inkubation mit der markierten Sonde zunächst für 30 Minuten auf Eis mit 1  $\mu\text{l}$  Antikörper gegen einen Transkriptionsfaktor inkubiert.

Für die Gelelektrophorese wurde ein Polyacrylamidgel (20 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 7,5 ml 5x TBE, 121 ml H<sub>2</sub>O, 1,25ml 10% APS, 125  $\mu\text{l}$  TEMED) gegossen. In 0,5x TBE (50 mM Tris, 50 mM Borsäure, 1 mM EDTA) als Laufpuffer lief das Gel für 30 Minuten

bei 100 V bevor die Proben geladen wurden. Die Proben wurden ohne Ladepuffer (Glycerin ist im 10x Puffer schon vorhanden) auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für ca. 3 Stunden, in der ersten Stunde bei 100 V, dann bei 150 V bis die Proben noch ca. 3-4 cm vom unteren Rand des Gels entfernt waren. Das Gel wird anschließend auf 2 *Whatman*-Papieren für ca. 2 Stunden getrocknet und die Banden durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

## 3.4 Histologische Methoden

### 3.4.1 Fixierung von Geweben und Einbettung in Paraffin

Das einzubettende Gewebe wurde entnommen, eventuell kurz in PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und anschließend in 4% PFA pH 7,2 über Nacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag wurde das fixierte Gewebe zunächst 30 Minuten mit PBS<sup>-/-</sup> und anschließend 30 Minuten mit einer 0,85%igen NaCl-Lösung bei 4°C gewaschen. Zur Entwässerung des Gewebes folgten zwei 15-minütige Inkubationen mit 0,85% NaCl/Ethanol (1:1), gefolgt von einer 15-minütigen und einer 30-minütigen Inkubation mit 70% Ethanol/0,85% NaCl bei RT. Die 30-minütige Inkubation kann durch eine Inkubation über Nacht ersetzt werden. Zur weiteren Entwässerung folgten Inkubationen mit 85% und 95% Ethanol/0,85% NaCl für jeweils 30 Minuten, dann dreimal 100% Ethanol für jeweils eine Stunde. Nach zweimaliger Inkubation in Xylol für 30 Minuten und abschließender Inkubation in Xylol über Nacht wurde das Gewebe zur Einbettung in ein Paraffin/Xylol(1:1)-Gemisch überführt und 1 Stunde bei 56 °C inkubiert. Schließlich wurden die Präparate mit Hilfe des Einbettungsgerätes *Tissue Tek TES* dreimal für jeweils eine Stunde in ein Bad mit flüssigem Paraffin gegeben. Aus dem Bad entnommen wurden die Präparate in Plastik-Kassetten mit Paraffin eingegossen und bei RT gelagert. Um eine RNase-Exposition des Gewebes zu vermeiden, die eine Verwendung der Gewebeschnitte für *in situ*-Hybridisierungen unmöglich machen würde, mussten bei der Bearbeitung der Gewebe stets Handschuhe getragen werden.

### **Besonderheit bei der Einbettung von Haut**

Bei der Einbettung von Haut, insbesondere Maushaut, aber auch sehr kleinen Organen, war es hilfreich, diese nach der ersten Fixierung in 4% PFA in 3%ige Agarose (3% Bacto-Agar in PBS<sup>-/-</sup>) einzubetten. Dazu wurde die Bacto-Agar-Masse erhitzt, eine Schicht Agar auf eine Glasplatte aufgebracht, die Haut glatt darauf ausgebreitet und mit einer weiteren Schicht Agar überschichtet. Nach dem Auskühlen wurde das Gewebestück mit dem Agar zurechtgeschnitten und erneut mindestens 3 Stunden in 4% PFA/PBS<sup>-/-</sup> fixiert. Anschließend folgte das Entwässerungsprotokoll wie unter Abschnitt 3.4.1 beschrieben.

### **3.4.2 Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten**

Mit Hilfe eines Weichschnittmikrotoms RM2155 wurden von Paraffinblöcken (s. Abschnitt 3.4.1) Schnitte von 6  $\mu$ m Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Diese wurden zum Trocknen der Schnitte über Nacht bei 42°C inkubiert und anschließend bei RT gelagert.

### **3.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zur histologischen Begutachtung der Gewebeschnitte wurden die Präparate mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt, wobei das Hämatoxylin die basophilen Zellkerne blau und das Eosin die eosinophilen Strukturen des Zytoplasmas, der Kollagene und der Muskeln rot färbt. Die Präparate wurden zunächst durch zweimalige Inkubation für 10 Minuten in Xylol deparaffiniert und dann durch eine absteigende Ethanolreihe jeweils 2 Minuten in 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% und 30% Ethanol hydratisiert. Anschließend wurden die Präparate 8 Minuten in Mayer's Hämatoxylinlösung gefärbt, 1 Minute in Leitungswasser gewaschen und für 20 Sekunden in 0,5% HCl/70% Ethanol gebläut. Danach wurden die Schnitte für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert, gefolgt von einem Bad in 0,5%iger Eosin-Lösung für 20 Sekunden. Nach der darauffolgenden aufsteigenden Ethanolreihe aus 70%, 80%, 100% Ethanol für jeweils 1 Minute, gefolgt von zwei zweiminütigen Inkubationen in Xylol zur erneuten Entwässerung der Schnitte wurden diese in

Entellan eingebettet und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

### 3.4.4 Immunhistochemie (IHC)

Die immunhistochemischen Färbungen wurden auf sogenannten Gewebe-*Microarrays* (TMA) von Plattenepithelkarzinomen, Basaliomen, aktinischen Keratosen, Melanomen und normaler Haut durchgeführt. Für einen solchen Gewebe-*Microarray* wurden Stanzbiopsien aus zahlreichen Gewebeproben der genannten Läsionen senkrecht in einen neuen Paraffinblock eingesetzt. Dieser Block wurde anschließend so geschnitten, dass sich in jedem Schnitt die Querschnitte aller Stanzbiopsien vorhanden sind, und die Schnitte auf Objektträger gezogen.

Diese TMAs wurden für zweimal 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe (jeweils 2 Minuten 100% , 95%, 90%, 80%, 70%, 50% und 30% Ethanol) gewässert. Anschließend wurden die TMAs einem Protokoll für die Antigendemaskierung in Zitratpuffer unterzogen. Hierzu wurden die Objektträger 10 Minuten in siedendem Zitratpuffer inkubiert. Nach 10 Minuten wurde die Schale mit Zitratpuffer (9 ml 0,1 M Zitronensäure, 41 ml 0,1 M Natriumcitrat) und den Objektträgern von der Heizplatte genommen. Die Objektträger verblieben noch 10 Minuten in dem heißen Puffer und wurden anschließend kurz in PBS<sup>-/-</sup> und Leitungswasser gewaschen. Zur Blockierung endogener Peroxidaseaktivität folgte eine Inkubation mit frisch hergestelltem 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 10 Minuten. Nach erneutem Waschen der Objektträger in PBS<sup>-/-</sup> wurden die TMAs für 10 Minuten mit 0,1% Trypsin in PBS<sup>-/-</sup> bedeckt. Das Trypsin wurde anschließend durch eine fünfminütige Inkubation in Trypsin-Inhibitor-Lösung (0,1 µg/ml Trypsin-Inhibitor in PBS<sup>-/-</sup>) inaktiviert. Zur Differenzierung folgte eine Inkubation der TMAs in 2N HCl/PBS<sup>-/-</sup> für 20 Minuten. Die Objektträger wurden anschließend erneut in PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und dann 30 Minuten bei RT mit Blockierungslösung behandelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Für die folgenden Schritte wurden die Komponenten des *Vectastain ABC Kits* verwendet. Als Blockierungslösung diente 0,1% BSA in PBS<sup>-/-</sup> mit Normalserum (150 µl auf 10 ml Blockierungslösung) der Spezies, aus welcher der Sekundärantikörper stammte. Der Primärantikörper wurde in Blockierungs-

lösung verdünnt (anti-Taps 1:200) und für 2 Stunden bei RT auf die Schnitte gegeben. Für einen Kontrollansatz wurde Blockierungslösung ohne Primärantikörper verwendet. Es folgte ein erneuter Waschschrift für 5 Minuten in PBS<sup>-/-</sup>. Der entsprechende biotinylierte Sekundärantikörper wurde 1:200 in Blockierungslösung verdünnt und für 30 Minuten bei RT auf den Präparaten inkubiert. Ein weiterer Waschschrift (5 Minuten, PBS<sup>-/-</sup>) entfernte nicht gebundenen Sekundärantikörper von den TMAs. Zur Verstärkung des Signals wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten mit ABC-Reagenz (5 ml Blockierungslösung, 2 Tropfen Reagenz A, 2 Tropfen Reagenz B), welches 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt werden musste, inkubiert. Danach wurden die Objektträger erneut in PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Für die Substratreaktion wurden die Präparate mit DAB (Diaminobenzidin)-Lösung (DAB Substrat *Kit*: 5 ml destilliertes Wasser, 2 Tropfen Pufferkonzentratlösung, 4 Tropfen DAB-Konzentratlösung, 2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) im Dunkeln inkubiert. Die Färbereaktion wurde in dH<sub>2</sub>O gestoppt und die Präparate mit Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt (s. Abschnitt 3.4.3).

### 3.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz

#### Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten

Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert (zweimal 10 Minuten) und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe jeweils 2 Minuten in 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% und 30% Ethanol rehydratisiert. Zur Demaskierung der Antigene standen zwei verschiedene Protokolle zur Verfügung:

Für Immunfluoreszenz-Färbungen auf die Differenzierungsmarker Keratin 10 und Keratin 6 wurden die Schnitte 10 Minuten in einem siedenden Zitratpuffer (9 ml 0,1 M Zitronensäure, 41 ml 0,1 M Natriumcitrat) inkubiert, anschließend wurde der Zitratpuffer mit den Schnitten von der Heizplatte genommen, so dass der Puffer auskühlen konnte. Dabei verblieben die Objektträger noch 10 Minuten in dem heißen Puffer. Nach Ablauf dieser zweiten 10 Minuten wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet.

Für Immunfluoreszenz-Färbungen auf Filaggrin, Loricrin, Taps und PCNA wurden die

Präparate nach der Rehydratisierung mit einem Fettstift umrandet und zur Antigen-Demaskierung mit einem Triton-X-100-Puffer (0,1% BSA/0,5% Triton-X-100 in PBS<sup>-/-</sup>) inkubiert. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Schnitte in PBS gewaschen.

Die nachfolgenden Schritte waren dann für alle Färbungen gleich:

Nach der Demaskierung wurden die Schnitte für 30 Minuten mit einer Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper zu blocken. Die verwendeten Primärantikörper wurden in der Blockierungslösung verdünnt (Keratin 10 1:250, Keratin 6 1:500, Filaggrin 1:500, Loricrin 1:400, Taps 1:400, PCNA 1:300).

Die Schnitte wurden nach Inkubation mit dem Primärantikörper dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 1 Stunde bei RT mit einem Sekundärantikörper (1:500 anti-Kaninchen, Cy3 oder Alexa488, 1:500 anti-Maus, Alexa488) sowie 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Bisbenzimid H33342 Fluorochrom zur Gegenfärbung der Zellkerne in Blockierungslösung inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit Mowiol (6 g Glyzerin, 2,4 g Mowiol 4-88, 6 ml H<sub>2</sub>O, 12 ml 200 mM Tris pH 8,5) eingedeckt und bis zur Dokumentation dunkel gelagert.

### **Immunfluoreszenz auf kultivierten Zellen**

Die zu analysierenden Zellen wurden in gewünschter Zellzahl auf Deckgläschen in Zellkulturschalen kultiviert, zweimal mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und anschließend mit 4% PFA/PBS<sup>-/-</sup> 15 Minuten fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen sowie zur Perforierung der Zellmembran erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten mit Triton-X-100-Puffer (0,1% BSA/0,5% Triton-X-100/PBS<sup>-/-</sup>). Der Primärantikörper wurde in Blockierungslösung verdünnt (0,1% BSA/0,2% Tween20/PBS<sup>-/-</sup>, PDI 1:250, E-cadherin 1:100) und die Zellen 2 Stunden damit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen bevor der Sekundärantikörper, ebenfalls in Blockierungslösung verdünnt (1:500 anti-Kaninchen, Cy3 bzw. 1:500 anti-Ziege, Cy3) und mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Bisbenzimid H33342 Fluorochrom für 0,5-1 Stunde zur Inkubation auf die Zellen pipettiert wurde. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und die Deckgläschen mit Mowiol auf Objektträgern



eingedeckt.

### 3.4.6 Phalloidin-Färbung

Phalloidin, ein Toxin des weißen Knollenblätterpilzes, bindet Aktinfilamente und kann aus diesem Grund dazu verwendet werden, das Zytoskelett von Zellen anzufärben, wenn es an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt vorliegt. Die Phalloidin-Färbung auf kultivierten Zellen wurde parallel zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung vorgenommen. Dazu wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben behandelt und zu dem Sekundäran-tikörper mit Bisbenzimid H33342 in der Blockierungslösung Phalloidin Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 in einer Verdünnung von 1:40 zugegeben.

## 3.5 Zellkulturmethoden

### 3.5.1 Kulturbedingungen

Die verwendeten HT1080-, HeLa- und HEK293-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) mit 10% FCS bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die murinen Keratinozyten-Zelllinien MCA3D und MCA3D/AT3 wurden in  $\alpha$ -MEM-Medium mit 10% fötalem Rinderserum bei 34°C und 6% CO<sub>2</sub> kultiviert. Sämtliche Arbeitsgänge wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt.

### 3.5.2 Passagieren von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80-90% trypsinisiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,2% Trypsin in PBS<sup>-/-</sup>/EDTA) abgelöst. Die Ablösung der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert, um die optimale Einwirkzeit des Trypsins festzustellen. Sobald die Zellen abgelöst waren, wurde die Reaktion durch Zugabe von 5-10 ml Medium gestoppt. Die Zellen wurden durch Auf-und Abpipettieren mit

einer Pipette vollständig von der Kulturschale gelöst und in ein 15ml-*Falcon*-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3 Minuten, 1 000 rpm, Megafuge 1.0, Heraeus) pelletiert, das Medium entfernt, die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert, ein Aliquot 1:200 verdünnt und im *Coulter Counter* gezählt. Danach wurde die gewünschte Zellzahl auf einer neuen Kulturschale ausgesät.

### 3.5.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die eingefroren werden sollten, wurden, wie unter 3.1.2 beschrieben, von der Kulturschale abgelöst, zentrifugiert und anschließend in vorgekühltem Medium mit 10% DMSO resuspendiert. Je 1 ml wurde in ein Kryo-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Nach einigen Minuten auf Eis wurden die Kryo-Röhrchen in einer Styropor-Box langsam auf -80°C abgekühlt und konnten dann bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Aufzutauende Zellen wurden im Kryo-Gefäß im Wasserbad bei 37°C rasch aufgetaut und in der Sterilbank in ein 15 ml-*Falcon*-Röhrchen überführt, in das 10 ml Medium vorlegt wurden. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3 Minuten, 1 000 rpm, Megafuge 1.0, Heraeus), das Medium abgesaugt, die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in einer 10 cm-Zellkulturschale ausgesät.

### 3.5.4 Mykoplasmen-Test

Um eine Kontamination der verwendeten Zelllinien mit Mykoplasmen auszuschließen, wurden in regelmäßigen Abständen Kontrollen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen alle 4-8 Wochen durch eine Färbung mit Bisbenzimid H33342 Fluorochrom überprüft. Nachdem die Zellen mindestens eine Woche ohne Antibiotika kultiviert worden waren, wurden sie auf Deckgläschen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen gewaschen, mit 4% PFA/PBS<sup>-/-</sup> 15 Minuten fixiert und anschließend 10 Minuten mit 1 µg/ml Bisbenzimid H3342 Fluorochrom in PBS<sup>-/-</sup> inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und die Deckgläschen mit Mowiol auf Objektträgern eingedeckt. Mykoplasmenfreie Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop durch einen klarabgegrenzten Kern

ohne zusätzliches Muster kleiner blauer Pünktchen, das im Falle einer Kontamination auftritt und die DNA der Bakterien anzeigt, identifiziert. Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden ausschließlich Kulturen ohne Mykoplasmen eingesetzt.

### 3.5.5 Transfektion eukaryontischer Zellen

#### Transfektion mit Kalziumphosphat

Am ersten Tag wurden Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät. Am zweiten Tag folgte die Transfektion: Je nach Zellzahl, die transfiziert werden sollte und je nach Größe der Kulturschale wurden 2-10  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA (für 12-well-Schale bzw. 10 cm-Kulturschale) mit einer Ethanolpräzipitation (s. Abschnitt 3.1.14) gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in der Sterilbank getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in steril-filtrierte  $\text{dH}_2\text{O}$  gelöst (je nach DNA-Menge in 112,5 (2  $\mu\text{g}$ ) - 450 (10  $\mu\text{g}$ )  $\mu\text{l}$ ). Zur gelösten DNA wurde 1/9 Volumen 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung pipettiert. Unter Schütteln des Eppendorfgefäßes, bevorzugt mit Hilfe eines Vortex-Gerätes, wurden zum DNA- $\text{CaCl}_2$ -Gemisch tropfenweise 1 Volumen 2x HBS-Puffer (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,05 mit NaOH, steril filtriert) hinzugefügt. Zur Bildung eines Kalziumphosphat-DNA-Präzipitats wurde die Lösung 20-30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Der Transfektionsansatz blieb bis zum nächsten Morgen auf den Zellen und wurde dann durch frisches Kulturmedium ersetzt.

#### Transfektion mit GenePORTER™-Reagenz

Die Transfektion mit *GenePORTER*™-Reagenz beruht auf dem Prinzip der Lipofektion, bei der die zu transfizierenden Plasmide in Mizellen aus amphiphilen Molekülen eingeschlossen werden und so von den Zellen aufgenommen werden. Das Plasmid wurde mit einer Ethanol-Natriumacetat-Mischung gefällt (s. 3.2), mit 70% Ethanol gewaschen und in der Sterilbank getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 125  $\mu\text{l}$  serum-freiem Medium pro  $\mu\text{g}$  DNA gelöst. 5  $\mu\text{l}$  *GenePORTER*™-Reagenz pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden in 125  $\mu\text{l}$  serum-freiem Medium pro  $\mu\text{g}$  DNA verdünnt. Anschließend wurden die gelöste DNA und

das verdünnte *GenePORTER*<sup>TM</sup>-Reagenz gemischt und 30 Minuten bei RT inkubiert. Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt, durch den DNA-*GenePORTER*<sup>TM</sup>-Mix ersetzt und die Zellen für 3-5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 1 Transfektions-Volumen Medium mit 20% FCS zu dem Mix auf die Zellen gegeben. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht.

### 3.5.6 Etablierung stabil transfizierter Zelllinien

Nach der Transfektion von Zellen mit einer der oben genannten Methoden wurden die Zellen zuerst drei Tage mit normalem Kulturmedium inkubiert. Nach drei Tagen wurde das Medium gegen Selektionsmedium mit G418 (Neomycin) ausgetauscht und die Zellen 14 Tage inkubiert. Zellen, die aufgrund der Transfektion das Expressionsplasmid mit dem Neomycin-Resistenzgen stabil in ihr Genom integriert hatten, überlebten den Selektionsdruck und wuchsen klonal aus. Während der 14 Tage wurde das Selektionsmedium jeden dritten Tag erneuert, zuletzt entfernt und die Zellklone mit PBS überschichtet. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Klone mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und einzeln in 48-well-Platten überführt in deren Vertiefungen Trypsin/EDTA vorgelegt wurde. Sobald die Zellen durch das Trypsin vereinzelt waren, wurden die Zellen in Selektionsmedium aufgenommen und in neue Vertiefungen überführt. Die Zellen wurden weiter kultiviert und in größere Kulturschalen umgesetzt sobald 80%ige Konfluenz erreicht ist.

# Kapitel 4

## Ergebnisse

### 4.1 Taps - Sequenz und Proteasedomäne

Die kodierende cDNA-Sequenz des murinen Taps, die in einem SSH-Ansatz gefunden wurde, umfasst 1020 Basenpaare und kodiert für ein Protein von 339 Aminosäuren (Abb. 4.1). Das Protein verfügt über eine Domäne, die typisch für retrovirale Aspartylproteasen, wie z.B. die HIV-Protease, ist. Darüber hinaus konnte im richtigen Leseraster ein zweiter Translationsstart (Methionin 84) identifiziert werden, der zur Bildung einer kleineren Proteinvariante führt.

Zu Beginn dieser Doktorarbeit war Taps eine neue potentielle Aspartylprotease, zu deren Lokalisation, Regulation und Funktion es nur sehr wenige Erkenntnisse gab. Die funktionelle und biochemische Charakterisierung von Taps stand daher im Mittelpunkt dieser Dissertation.

### 4.2 Herstellung eines polyklonalen Taps-spezifischen Antikörpers

Für die Charakterisierung der Taps-Expression in humanen und murinen epithelialen Geweben war es unerlässlich, nicht nur die mRNA von Taps mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung

```

AACAAAGGAGAAATGAGGAACCCCTGGGGGCCAGGTTGGGCATCAAAAAGGCCCTGCAGAAGAAGCAGAACACAGCCTGC
M R N P G G P G W A S K R P L Q K K Q N T A C
CTCTGTGCCAGCAGCCAGCCAGACACTTTGTACCGGCTCCCTTCAACTCGTCCAGGCAGGGCAAGAACACGGCCAGCC
L C A Q Q P A R H F V P A P F N S S R Q G K N T A Q P
GACAGAGCCCTCGCTCTCCAGCGTGATTGCGCCACACTCTTCTGTGCGTTTCTTTACTTGGCTTGTGTTACTGCTGAAC
T E P S L S S V I A P T L F C A F L Y L A C V T A E
TTCCAGAGGTGAGCAGAAGGATGGCCACCAGCGGAGTCAGAAGCAAGGAAGGACGCCGGGAGCATGCCCTCGTCCAGAA
L P E V S R R M A T S G V R S K E G R R E H A F V P E
CCTTTCACTGGTACTAACTTAGCTCCCGACCTTTGGCTGCACCGCTTTGAAGTCATTGATGACCTCAACCATTTGGGATCA
P F T L A P S L W L H R F E V I D D L N H W D H
TGCCACCAAACTGAGGTTCTGAAAGAGTCGCTCAAGGGAGATGCCCTGGATGCTACAATGGACTCAGTTCCCGAGCCC
A T K L R F L K E S L K G D A L D V Y N G L S S Q A
AGGGCGATTTTCAGTTTGTGAAGCAAGCCCTCCTGAGGGCCCTTTGGGGCCCTGGGGAGGCCTTCAGTGAGCCCAAGAG
Q G D F S F V K Q A L L R A F G A P G E A F S E P E
ATTTTGTGTTGCCAACAGCATGGGTAAGGGCTACTACCTTAAAGGGAAGGTTGGCCATGTGCCTGTGAGATTCTGGTGGA
I L F A N S M G K G Y Y L K G K V G H V P V R F L V D
CTCTGGGGCTCAGGTGTCTGTGGTTCAACCCGCTTATGGGAGGAGTCACTGATGGTGACCTGGATACTCTTCGTCTTT
S G A Q T V S V V H P A L W E E V T D G D L D T L R P
TTAACAATGTGGTCAAAGTGCCCAATGGGCGAGAGATGAAGATCTTGGGTGTGTGGGACACAGAAATTAGCCTGGGCAAG
F N N V V K V A N G A E M K I L G V W D T E I S L G K
ACAAAGCTGAAGCCGAGTTTCTGGTGGCCACGCCAGCGCAGAAGAGGCTATTATTGGCACAGACGTCTTGACAGGACCA
T K L K A E F L V A N A S A E E A I I G T D V L Q D H
CAATGCCGTGCTGGACTTCGAACACCCGACCTGCACCCCTGAAGGGGAAGAAGTTCGCGCTGCTCCCTGTGCGGAGCTCCT
N A V L D F E H R T C T L K G K K F R L L P V G S S
TGGAGGATGAGTTTGACCTGGAGCTTATTGAGGAAGAGGAGGGGTCTTCTGCACCGGAGGGCTCCCACTAAGAAACCCCA
L E D E F D L E L I E E E E G S S A P E G S H *
TTTCTTGTTCACGACATTTGTAGGGGACTTTGTGTGGGGGAGCAGATGTCCTGGGGGTATCATCCGGCCTAGCCAG
TCTTTACACCGGTTCTCAGTTTCCTCCTTCTACAGGGGCTTGTCTTGCCTTTGTTTGGGAGGGAGGCCAGCTTGGTG
GCCAAAGCAGTGTCCCAAGGTCTGCAAAGACTTCCAAGGCTGGCAGGAGCTTCTGAGGAAGCCAGGAATGTCAATCTT
GAGAGAGGACCCTTTTAGATCCCCTGAAGTATGGCTCAGTCACCTTACCGTCCCAAGCCTGCTGAGCTGAGCCTGGTCT
TGGCTAAGACCCTCACAATCCAGATGCTTGGAGGAGACTGGCAGCTGCTTTGGGAGTCTCCTGAGTCTCCACCTGC
ACAAGGATGTCCTCCTGTCTGCTTCACTTGCCTTGAATCTCATGGAGCCTGTATCAATAATTCAATTATTTCAAAACAC
CAATAAAGATCTGTTTCATGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

**Abb. 4.1: Taps-Sequenz.** Sequenz der murinen Taps-cDNA mit dem offenen Leseraster von 1020 Basenpaaren. Das Leseraster kodiert für ein Protein von 339 Aminosäuren. Start- und Stopkodon sind durch Fettdruck hervorgehoben. Das für retrovirale Aspartylproteasen typische Motiv ist durch rote Buchstaben gekennzeichnet (AS 207-218). Der Sequenzteil, der über den SSH-Ansatz kloniert wurde, ist unterstrichen.

nachweisen zu können, sondern auch das Protein selbst. Aus diesem Grund wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) zwei polyklonale Kaninchen-Antikörper generiert, die sowohl das humane als auch das murine Taps binden können. Für die Immunisierung der Kaninchen wurden zwei Peptidsequenzen (**LWEEVTDGDLDTL** (AS 224 - 236, EP050131) und **LEDEFDLELIEE** (AS 319 - 330, EP050132), s. Abb. 4.2) ausgewählt, die bei Mensch und Maus zu 100% homolog sind. Beiden Kaninchen wurde dreimal eine Mischung beider Peptide injiziert, um die Wahrscheinlichkeit für einen funktionellen Antikörper zu erhöhen.

hTaps	MGSPGASLGI	KKALQSEQAT	ALPASAPAVS	QPTAPAPSCL	PKAGQVIPAL
cTaps	MGSPGASLGI	KKALQSEKAT	ALPASAPAVS	QPTAPAPSCL	PKAGQVIPAL
mTaps	MRNPGGPGWA	SKRPLQKKQN	TACLCAQQPA	RHFVPAPFNS	SRQGKNT.AQ
rTaps	.....	.....	.....	.....	.....
bTaps	.....	.....	.....	.....	.....
▼					
hTaps	LREAPFSSVI	APTLGCGFLF	LAWVAAEVPE	ESSRMAGSGA	RSEEGRRQHA
cTaps	LREAPFSSVI	APTLGCGFLF	LAWVAAEVPE	ESSRMAGSGA	RSEEGRRQHA
mTaps	PTEPSLSSVI	APTLFCAFLY	LACVTAELPE	VSRRMATSGV	RSKEGRREHA
rTaps	.....	.....	.....	...MAASGV	RSKEGRREHA
bTaps	.....	.....	.....	...MAGSGV	RSQE....RA
hTaps	FVPEPFDGAN	VVPNLWLHSF	EVINDLNHWD	HITKLRFLKE	SLRGEALGVY
cTaps	FVPEPFDGAN	VVPNVWLHRF	EVINDLNHWD	NITKLRFLKE	SLRGEALDVY
mTaps	FVPEPFTGTN	LAPSLWLHRF	EVIDDLNHWD	HATKLRFLKE	SLKGDALDVY
rTaps	FVPEPFNGTN	VAPSLWLNRF	EVIDDLNHWD	HATKLRFLKE	SLRGDALDVY
bTaps	FVPEPFDGAS	VAPHLWLHRF	EVINHLNHWD	HITKLRFLKE	SLRGDALGAF
hTaps	NRLSPQDQGD	YGTVKEALLK	AFGVPGAAPS	HLPKEIVFAN	SMGKGYYLKG
cTaps	NRLSPQDQGD	YGTVKEALLK	AFGVPGAAPS	HLPKEIVFAN	SMGKGYYLKG
mTaps	NGLSSQAQGD	FSFVKQALLR	AFGAPGEAFS	E.PEEILFAN	SMGKGYYLKG
rTaps	NGLDSQAQGD	YNTVKEALLK	SFGGLGAAHN	K.PKEIVFAN	SMGKGYYLKG
bTaps	NGLSPEDQGN	YEAVKETLLK	TFGGPEAAHS	HLPKEIVFAN	SMGKGYYLKG
hTaps	KIGKVPV <b>RFL</b>	<b>VDSGAQVSVV</b>	HPNLWEEVTD	GDLDTLQPFE	NVVKVANGAE
cTaps	KIGKVPV <b>RFL</b>	<b>VDSGAQVSVV</b>	HPNLWEEVTD	GDLDTLQPFE	NVVKVANGAE
mTaps	KVGHPV <b>RFL</b>	<b>VDSGAQVSVV</b>	HPAL <b>WEEVTD</b>	<b>GDLDTL</b> RPFN	NVVKVANGAE
rTaps	KIGHVPV <b>RFL</b>	<b>VDSGAQVSVV</b>	HPALWEEVTD	ADLDTLRPFD	NVVKVANGAE
bTaps	KIGKVPV <b>RFL</b>	<b>VDSGAQVSVV</b>	HPSLWEEVTD	GELDTLRPFE	NVVKVANGAE
hTaps	MKILGVWDTA	VSLGKCLKKA	QFLVANASAE	EAIIGTDVLQ	DHNAILDFEH
cTaps	MKILGVWDTA	VSLGKCLKKA	QFLVANASAE	EAIIGTDVLQ	DHNAILDFEH
mTaps	MKILGVWDTE	ISLGKTKLKA	EFLVANASAE	EAIIGTDVLQ	DHNAVLDFEH
rTaps	MKILGVWDTE	VALGKCLKLEA	HFLVANASAE	EAIIGTDVLQ	DHNAVLDFEH
bTaps	MKILGVWDTV	VSLGKCLKKA	AFLVANASAE	EAIIGTDVLQ	DHNAVLDFEH
hTaps	RTCTLKGKKF	RLLPVGGSLE	DEFDLELIEE	DPSSEEGRQE	LSH
cTaps	RTCTLKGKKF	RLLPVGGSLE	DEFDLELIEE	DPSSEEGRQE	LSH
mTaps	RTCTLKGKKF	RLLPVGGS <b>LE</b>	<b>DEFDLELIEE</b>	EEGSSA...PE	GSH
rTaps	RTCTLKGKKF	RLLPVGGSLE	DEFDLELIEE	ESSA...PE	ASH
bTaps	RTCTLKGKKF	RLLPVGGSLE	DEFDLELIEE	EPSSEEGGQQ	LSC

Abb. 4.2: Multi-Alignment der bekannten Taps-Homologe. Die Aminosäuresequenzen von Taps beim Menschen (hTaps), Schimpansen (cTaps), bei der Maus (mTaps), der Ratte (rTaps) und beim Rind (bTaps) wurden untereinander aufgelistet, um Homologien und gemeinsame Sequenzabschnitte zu verdeutlichen. Das schwarze Dreieck zeigt das zweite Startkodon im richtigen Leseraster, das in allen Spezies konserviert ist. Grüne Buchstaben zeigen die Aminosäuren, die für das aktive Zentrum von Aspartylproteasen charakteristisch sind. Die Peptidsequenzen, die genutzt wurden, um einen spezifischen polyklonalen Antikörper gegen Taps zu generieren, sind rot markiert.

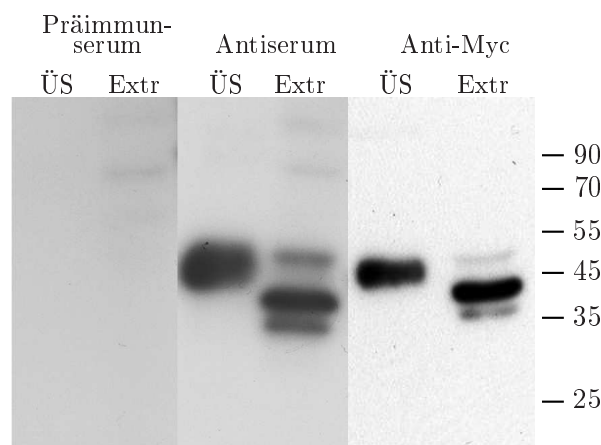
### 4.2.1 Spezifität des Anti-Taps-Antikörpers in Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen

Von der Firma Eurogentec wurden Präimmunserum beider Kaninchen, Serum nach der zweiten und dritten Injektion (*Boost*) und nach dem Ausbluten der Tiere geliefert. Zusätzlich stand eine kleine Menge aufgereinigten Antikörpers und jeweils zwei Milligramm der beiden Peptide zur Verfügung. Bevor das Serum, das den neu generierten Anti-Taps-Antikörper enthalten sollte, für gezielte Expressionsanalysen eingesetzt werden konnte, musste zunächst seine Spezifität für das Taps-Protein sichergestellt werden.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden HT1080-Zellen mit einem Expressionsplasmid transient transfiziert, das für ein Taps-Protein mit C-terminalem Myc/His-*tag* kodiert. Affinitätschromatografisch aufgereinigte Zellextrakte und Zellkulturüberstände dieser Zellen wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt, die *Western Blot*-Membran geteilt und je ein Teil mit Präimmunserum, mit Serum nach dem zweiten *Boost* oder einem Anti-Myc-Antikörper inkubiert. Auf der mit Präimmunserum inkubierten Membran wurden keine Banden sichtbar (Abb. 4.3, links). Auf dem Teil des *Blots*, der mit dem zu prüfenden Anti-Taps-Antiserum inkubiert wurde, wird im Überstand der transfizierten Zellen (ÜS) eine Bande sichtbar und im Extrakt drei Banden (Abb. 4.3, Mitte). Das gleiche Ergebnis wurde mit dem Anti-Myc-Antikörper erzielt (Abb. 4.3, rechts). Der Vergleich beider Antikörper machte dabei deutlich, dass das Anti-Taps-Antiserum spezifische Banden erkennt, die in Bezug auf das Molekulargewicht den verschiedenen Taps-Varianten entsprechen (vergl. Abschnitt 4.8). Damit wurde nachgewiesen, dass sich im Serum der Kaninchen nach dem zweiten *Boost* Antikörper befinden, die spezifisch an Proteine aus Taps-transfizierten Zellen binden, und die im Serum vor der ersten Peptidinjektion (Präimmunserum) noch nicht vorhanden waren. Dieser Versuch wurde ebenfalls mit dem zweiten zur Verfügung stehenden Serum durchgeführt, welches jedoch im *Western Blot* mehr unspezifische Banden sichtbar werden ließ. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Experimente das erste getestete Serum verwendet.

Zum weiteren Nachweis der Spezifität des Antikörpers wurden mehrere Peptidkompe-



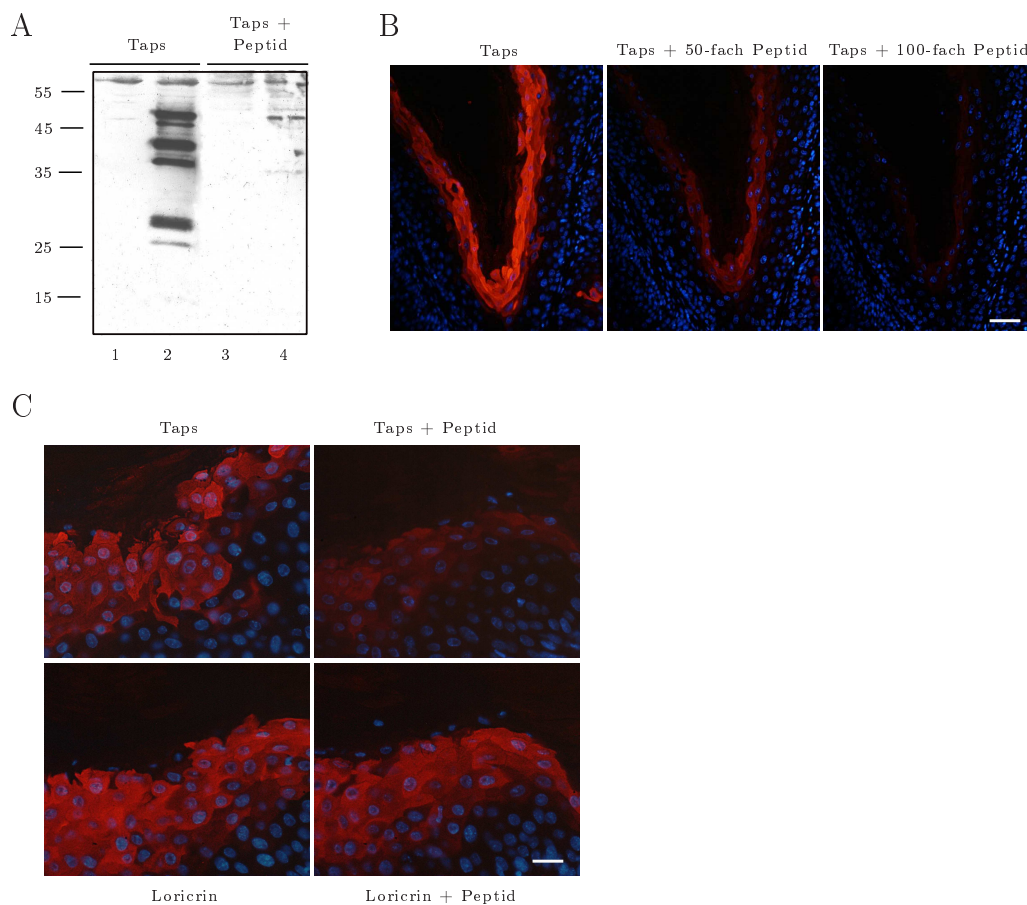


**Abb. 4.3: Der Anti-Taps-Antikörper erkennt Taps-Protein im *Western Blot*.** In einem *Western Blot* wurden Zellkulturüberstände (ÜS) und Zellextrakte (Extr) von Taps-transfizierten Zellen in mehreren Spuren aufgetragen. Je ein Teil des *Blots* wurde mit Präimmunserum, mit Anti-Taps-Antiserum (jeweils 1:100 in Blockierungslösung) bzw. mit einem Anti-Myc-Antikörper (1:2000 in Blockierungslösung) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Sekundärantikörper diente ein HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen- (1:2500, Präimmunserum und Antiserum) bzw. Anti-Maus-Antikörper (1:2000, Anti-Myc).

titionsexperimente durchgeführt.

In einem *Western Blot* wurden Zellextrakte von transient transfizierten HeLa-Zellen (Leervektor und hTaps) aufgetragen. Eine Hälfte der Membran wurde mit dem neuen Anti-Taps-Antikörper (gereinigt gegen das Peptid EP050132) inkubiert, die zweite Hälfte wurde mit einer Mischung aus Anti-Taps-Antikörper und 100-fachem Überschuss an Peptid EP050132 inkubiert (Abb. 4.4A). Für die Peptidkompetition wurden Antikörper und Peptid 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Bei der Auswertung der beiden *Blot*-Hälften wurden nach der Inkubation mit dem Anti-Taps-Antikörper in der Leervektorkontrolle (Spur 1) keine spezifischen Banden sichtbar, während in Spur 2 mehrere Banden für die verschiedenen Taps-Varianten detektiert wurden. Im Vergleich hierzu war mit der Mischung aus Anti-Taps-Antikörper und kompetitierendem Peptid die Stärke der Signale in Extrakten der Taps-transfizierten Zellen deutlich reduziert (Spur 4). Das Experiment zeigt somit, dass durch Vorinkubation des Antikörpers mit einem Überschuss an Taps-Peptid die Bindung des Antikörpers an Taps-Protein verhindert werden kann.

Um die spezifische Bindung des Antikörpers an Taps-Protein in Immunfluoreszenz-Analysen nachzuweisen, wurden zwei weitere Peptidkompetitionsexperimente durchge-



**Abb. 4.4: Der Anti-Taps-Antikörper erkennt spezifisch endogenes und rekombinantes Taps.** **A** *Western Blot* nach Inkubation mit Anti-Taps-Antikörper (1:100) allein (links, Spuren 1 und 2) oder in Kombination mit dem Peptid EP050132 gegen das der Antikörper produziert wurde (rechts, Spuren 3 und 4). Das Peptid wurde im 100-fachen Überschuss eingesetzt. Als Proben wurden Proteinextrakte von transient transfizierten HeLa-Zellen nach affinitätschromatografischer Aufreinigung (Spuren 1 und 3: Leervektor, Spuren 2 und 4: Taps) geladen. **B** Indirekte Immunfluoreszenz mit dem Anti-Taps-Antiserum (1:400) auf Paraffinschnitten eines Maus-Papilloms ohne (links) oder mit kompetitierendem Peptid in zwei verschiedenen Konzentrationen: im 50-fachen Überschuss gegenüber dem Taps-Antikörper (Mitte) oder im 100-fachen Überschuss (rechts). Für die Peptidkompetition wurde der Antikörper 30 Minuten bei RT vorinkubiert. Als Sekundärantikörper diente ein Cy3-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper (1:500, rotes Signal). Die Schnitte wurden mit H33342 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , blau) gegengefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. (Größenmarker: 50  $\mu\text{m}$ ) **C** Indirekte Immunfluoreszenz mit Anti-Taps-Antiserum (1:400) bzw. Anti-Loricrin-Antikörper (1:400) auf Paraffinschnitten eines Maus-Papilloms ohne (linke Spalte) oder mit 100-fachem Peptidüberschuss (rechte Spalte). Die Durchführung erfolgte wie unter B beschrieben. (Größenmarker: 25  $\mu\text{m}$ )

führt. Der erste Ansatz sollte klären, ob der Anti-Taps-Antikörper an Taps-Protein in Paraffinschnitten von epithelialen Gewebe binden kann und ob diese Bindung durch Vor-

inkubation des Antikörpers mit einem Überschuss an Taps-Peptid gehemmt wird. Hierfür wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse auf einem Papillom der Maushaut durchgeführt, da eine starke Taps-Expression auf mRNA-Ebene für Papillome bereits nachgewiesen werden konnte. Gewebeschnitte des Papilloms wurden entweder mit Anti-Taps-Antikörper allein oder mit einer Mischung von Antikörper und Peptid EP050132 inkubiert, wobei das Peptid im 50-fachen bzw. 100-fachen Überschuss im Vergleich zur Antikörperkonzentration eingesetzt wurde. Nach der Inkubation mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper konnte auf dem nur mit Antikörper inkubierten Gewebeschnitt ein deutliches Signal (rote Fluoreszenz) für Taps detektiert werden, während das Signal bei Inkubation mit Antikörper und Peptid stark reduziert (bei 50-fachem Peptidüberschuss) bzw. kaum noch detektierbar (bei 100-fachem Peptidüberschuss) war (Abb. 4.4B). Eine Peptidkompetition ist demzufolge auch in Immunfluoreszenz-Analysen möglich und die Effizienz der Kompetition steht in direktem Zusammenhang mit der Menge des eingesetzten Peptids.

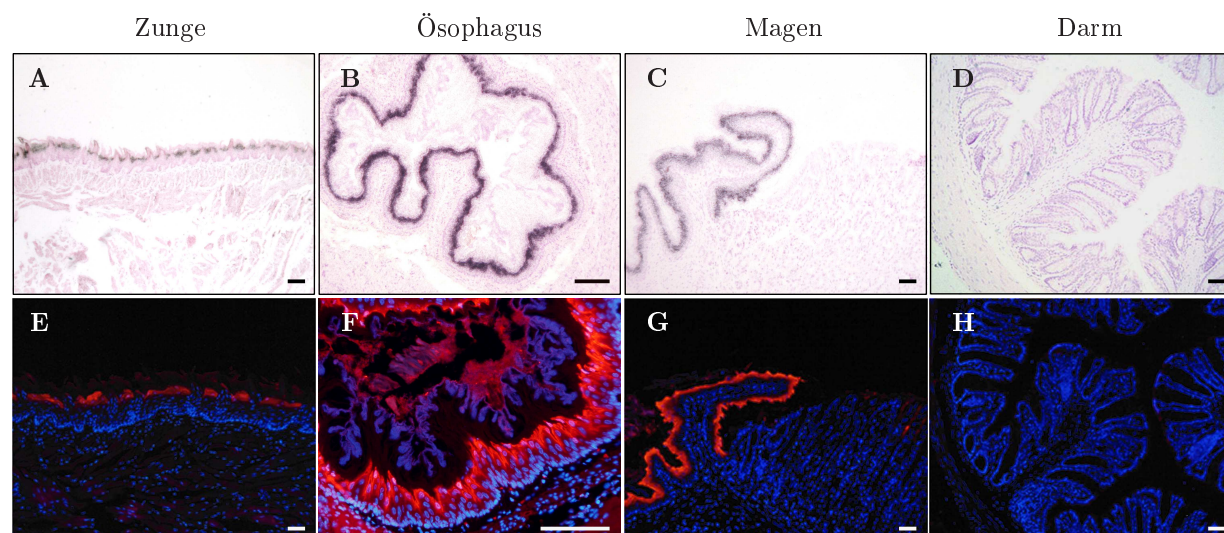
Das zweite Experiment sollte zeigen, ob das Peptid in der Kompetition spezifisch die Bindung des Antikörpers an Taps hemmt oder ob es unspezifisch auch die Bindung anderer Antikörper in der Immunfluoreszenz-Analyse verhindert. Die hierzu durchgeführte indirekte Immunfluoreszenz-Analyse ergab, dass Taps und Loricrin stark in differenzierten Stellen des Papilloms exprimiert werden. Nach Inkubation mit der Antikörper-Peptid-Lösung ist das Signal für Taps stark reduziert, während für Loricrin keine Verminderung des Signals erkennbar wird (Abb. 4.4, rechte Spalte).

### 4.3 Expression von Taps-Protein in adultem Mausgewebe

*In situ*-Hybridisierungen (ISH) hatten bereits ergeben, dass *taps*-mRNA suprabasal in mehrschichtigen, unverhornten Epithelien, z.B. der Mundschleimhaut, der Zunge und dem Ösophagus exprimiert wird. Es stellte sich nun die Frage, ob Taps-Protein ausschließlich in den Zellen nachgewiesen werden kann, die *taps*-mRNA exprimieren oder ob aufgrund der

nachgewiesenen Sekretion [99] Taps zusätzlich an anderen Stellen im Gewebe lokalisiert wird. Durch die Generierung eines Taps-spezifischen Antikörpers (vergl. 4.2) konnte nun die Proteinexpression von Taps und dessen Lokalisation im Gewebe bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden indirekte Immunfluoreszenz-Analysen auf Paraffinschnitten jener adulten Mausgewebe durchgeführt, die bereits für die ISH-Experimente verwendet wurden. Dadurch konnte die Lokalisation von *taps*-mRNA und Taps-Protein direkt verglichen werden.

### 4.3.1 Expression in normalem adultem Gewebe



**Abb. 4.5: Expression von Taps mRNA und Protein in adultem Maus-Gewebe.** *In situ*-Hybridisierung mit einer  $^{35}\text{S}$ -markierten anti-sense Probe (schwarzes Signal in **A** bis **D**) und indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit einem Taps-spezifischen Antiserum (1:400) in Kombination mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500, rotes Signal in **E** bis **H**) zeigten Taps-Expression in mehrschichtigen Epithelien der Zunge (**A**, **E**), des Ösophagus (**B**, **F**) und des Vormagens (**C**, **G**). In einschichtigen Epithelien, z. B. im Kolon (**D**, **H**), konnte keine Taps-Expression nachgewiesen werden. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin oder H33342 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , blau) gegengefärbt. (Größenmarker: 100  $\mu\text{m}$ )

In Abbildung 4.5 sind die Ergebnisse beider Nachweise zusammengestellt: Als Beispiele für die suprabasale Expression in mehrschichtigen Geweben sind die Zunge (**A** und **E**), der Ösophagus (**B** und **F**) und der Vormagen (**C** und **G**) der Maus abgebildet. Das Kolon (**D** und **H**) dient als Negativ-Beispiel: Hier und in anderen einschichtigen Epithelien (s. [99])

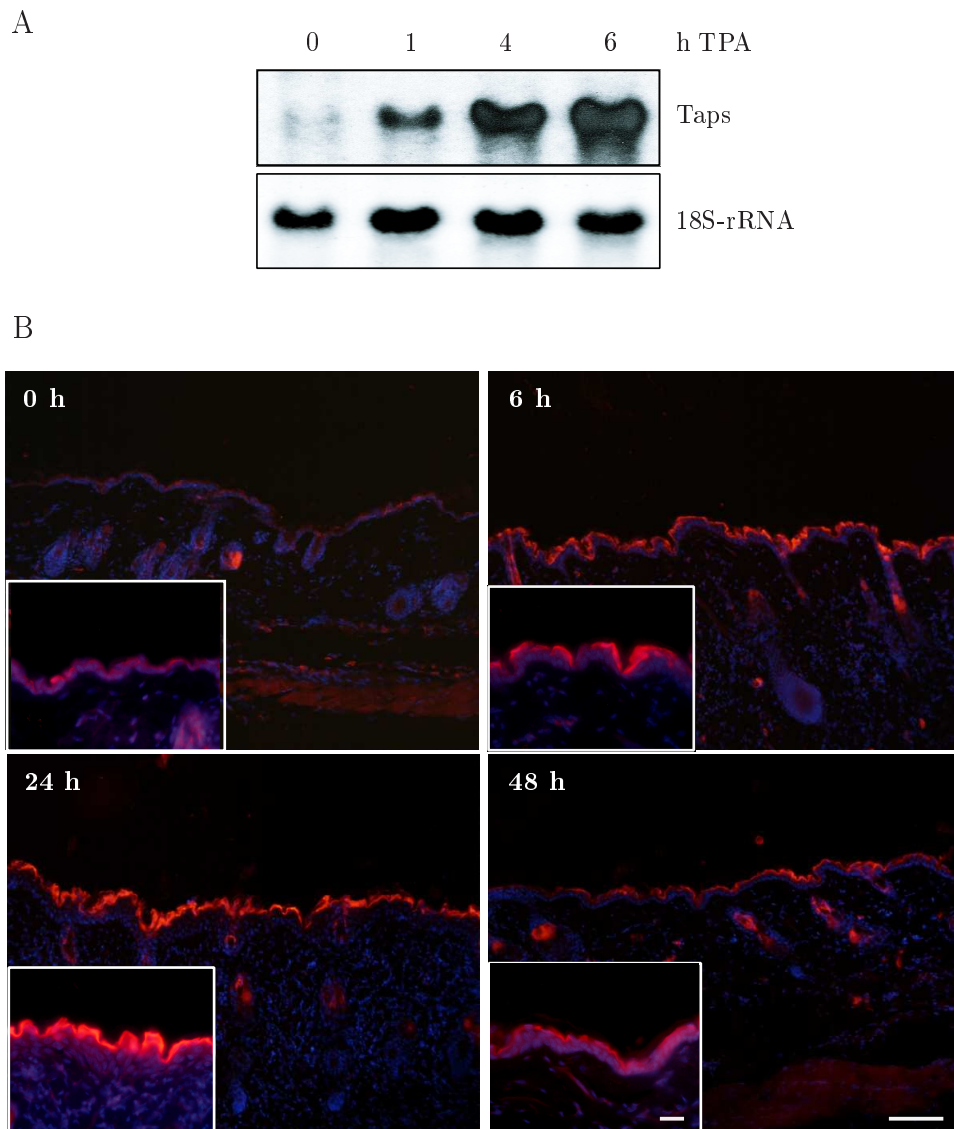
wird Taps auf mRNA-Ebene kaum exprimiert. Die Analyse der Proteinexpression mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz unter Verwendung des Taps-spezifischen Antikörpers belegte, dass das Taps-Protein in denselben Zell-Schichten (suprabasal, aber nicht in den obersten Schichten) lokalisiert ist wie die *taps*-mRNA. Darüber hinaus ergab die Analyse der Proteinexpression in der Haut eine zusätzliche Färbung in differenzierten Zellen der Talgdrüsen, die direkt in die Haarfollikel münden. Dieses Ergebnis konnte anschließend auch in den Proben der ISH für die mRNA-Expression bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

## 4.4 Expression von Taps-Protein nach TPA-Behandlung und in Hauttumoren

### 4.4.1 Expression nach TPA-Behandlung

*Taps* wurde ursprünglich als Gen identifiziert, dessen Expression nach TPA-Behandlung der Maus-Rückenhaut stark induziert wird. Um herauszufinden, wie rasch nach einer TPA-Behandlung die Induktion der Taps-Expression erfolgt, wurde eine Kinetik angefertigt, bei der die Rückenhaut von Mäusen mit TPA behandelt und anschließend zu den angegebenen Zeitpunkten (unbehandelt, nach 1, 4, 6, 24 und 48 Stunden) für Gewebeschnitte präpariert wurde. Zusätzlich wurde aus Hautproben der Zeitpunkte 0 (unbehandelt), 1, 4 und 6 Stunden nach der TPA-Behandlung Gesamt-RNA extrahiert. Mit dieser Gesamt-RNA wurde ein *Northern Blot* mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Taps-spezifischen Sonde durchgeführt. Die Auswertung der Signale (Abb. 4.6A) zeigte, dass basal eine geringe Menge *taps*-mRNA vorliegt und eine erhöhte Menge an *taps*-Transkript schon nach einer Stunde nachgewiesen werden kann. Die Menge an *taps*-mRNA nahm bis mindestens sechs Stunden nach der TPA-Behandlung stetig zu.

Auf den Gewebeschnitten wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem Anti-Taps-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (rote Fluoreszenz) durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass in unbehandelter Haut nur eine sehr schwache basale



**Abb. 4.6: Kinetik der Taps-Expression in der Maushaut nach TPA-Behandlung.** Die Rückenhaut der Mäuse wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach der TPA-Behandlung präpariert und entweder zur RNA-Präparation verwendet oder in Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. **A** Ein *Northern Blot* mit Gesamt-RNA aus TPA-behandelter Rückenhaut wurde mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Taps-spezifischen Probe hybridisiert und das Signal durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Als Kontrolle der RNA-Qualität und -quantität diente eine  $^{32}\text{P}$ -markierte Probe gegen 18S-rRNA. Dieser *Northern Blot* wurde von Dr. U. Breitenbach zur Verfügung gestellt. **B** Eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse mit dem Taps-spezifischen polyklonalen Antiserum (1:400) wurde auf 6  $\mu\text{m}$  dicken Paraffinschnitten durchgeführt. Das Taps-Protein wurde mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500, rot) sichtbar gemacht. Die Kerne wurden mit H33342 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , blau) gegengefärbt und die Bilder mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. (Größenmarker: 100  $\mu\text{m}$  (große Aufnahmen) bzw. 25  $\mu\text{m}$  (Einsätze))

Taps-Proteinmenge in einzelnen Keratinozyten, im Haarfollikel und in Talgdrüsen detektiert werden kann. Sechs Stunden nach Behandlung war die Expression bereits deutlich verstärkt, erreichte ihr Maximum ca. 24 Stunden nach der Behandlung und nahm dann wieder ab. 48 Stunden nach der Behandlung war die Taps-Proteinmenge schon fast wieder auf die Intensität der unbehandelten Rückenhaut reduziert.

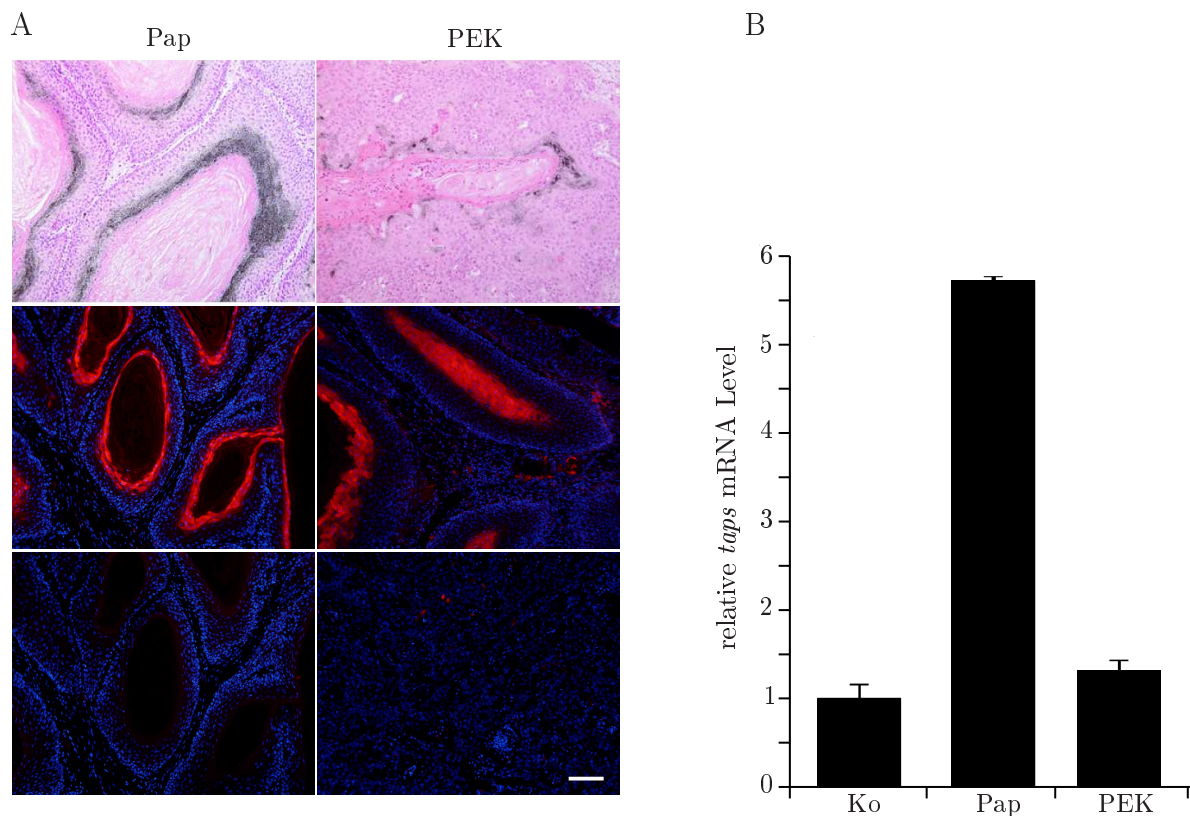
#### 4.4.2 Expression in der Mehrstufenkarzinogenese der Maushaut

*Taps* ist nicht nur ein TPA-induzierbares Gen in der Rückenhaut, sondern wird auch in Tumorproben der chemisch induzierten Hautkarzinogenese der Maushaut stark exprimiert. In benignen Tumorproben, den Papillomen, konnten in einer *in situ-Hybridisierung* starke Signale für *taps* detektiert werden (Abb. 4.7A, oben links), in späten, malignen Stadien der Karzinogenese, dem Plattenepithelkarzinom (PEK), exprimierten nur noch vereinzelte Tumorzellen im Bereich verhornter Einschlüsse (Hornperlen) *taps* (Abb. 4.7A, oben rechts).

In einer quantitativen RT-PCR (RQ-PCR) wurden die Ergebnisse der ISH überprüft und quantifiziert. Für die Analyse der *taps*-mRNA-Mengen standen cDNA-Proben von normaler Rückenhaut (als Kontrolle) sowie von Papillomen und Plattenepithelkarzinomen (PEK) zur Verfügung. Die quantitative RT-PCR ergab eine etwa acht-fache Induktion der *taps*-mRNA-Expression in Papillomen gegenüber normaler Rückenhaut, wohingegen im PEK praktisch keine Induktion im Vergleich zur unbehandelten Rückenhaut detektiert werden konnte.

In einer indirekten Immunfluoreszenz konnte das Expressionsmuster auf Proteinebene bestätigt werden: In Papillomen und verhornten Bereichen von Plattenepithelkarzinomen kann Taps detektiert werden. In undifferenzierten und unverhornten Bereichen eines PEK war jedoch keine Expression nachweisbar (Abb. 4.7A, mittlere und untere Reihe).





**Abb. 4.7: Taps-Expression in der Mehrstufenkarzinogenese.** Aus normaler Rückenhaut der Maus (Ko) sowie benignen (Pap) und malignen (PEK) Tumorproben, die über das Protokoll der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese generiert wurden, wurde Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. **A** *In situ*-Hybridisierung mit einer <sup>35</sup>S-markierten anti-sense Probe (schwarzes Signal, oberen Reihe) und indirekte Immunfluoreszenz-Analysen mit einem Taps-spezifischen Antiserum (1:400) auf Gewebeschnitten eines Papilloms und eines gut differenzierten Plattenepithelkarzinoms (PEK, rotes Signal, mittlere Reihe) sowie eines dedifferenzierten malignen Tumors (unten rechts). Als Kontrolle wurde ein Gewebeschnitt eines Papilloms nur mit dem Zweitantikörper (1:500) inkubiert (unten links). (Größenmarker: 100  $\mu$ m) **B** Die quantitative RT-PCR wurde mit *hprt* als internem Standard durchgeführt. Die relative Taps-Expression der normalen Rückenhaut wurde auf eins gesetzt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler eines Experimentes wieder, das dreimal wiederholt wurde.

## 4.5 Taps-Expression in Keratinozyten-Zelllinien

Eine Analyse der Taps-Expression auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Keratinozyten-Zelllinien wurde durchgeführt um herauszufinden, ob das spezifische Expressionsmuster, das für benigne und maligne Tumore identifiziert werden konnte, auch in Keratinozyten *in vitro* nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus konnten durch diese Analyse



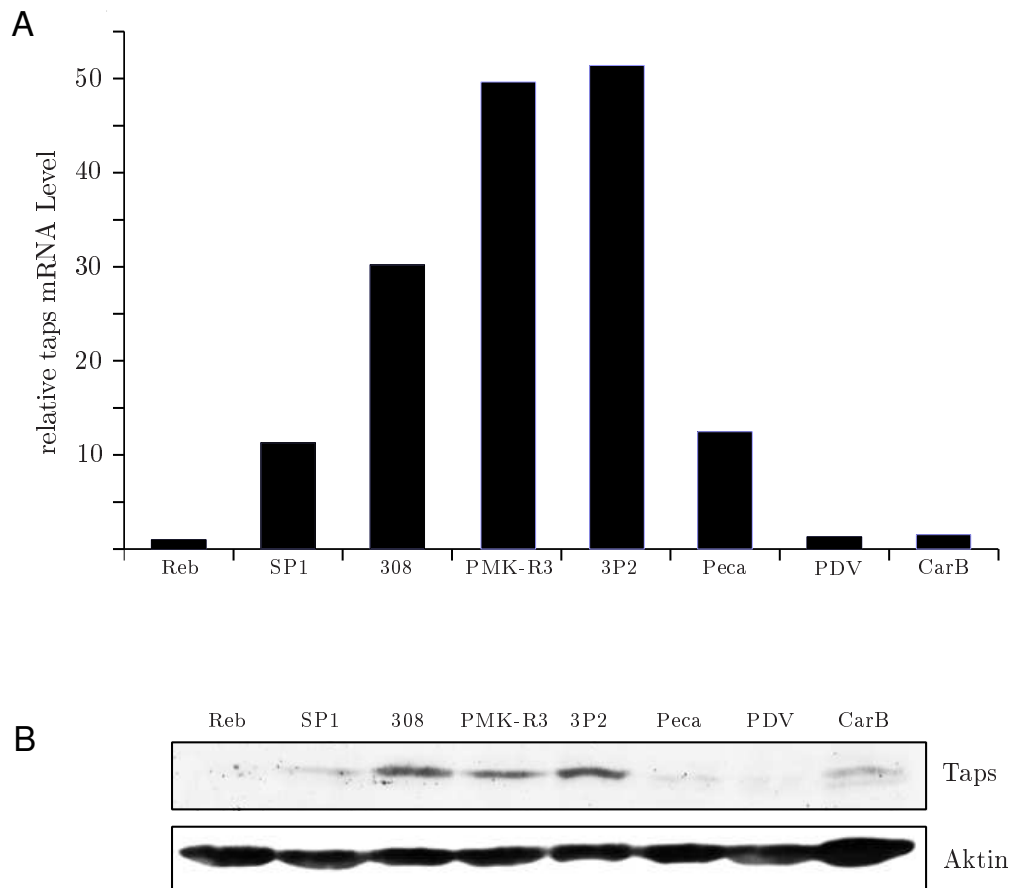
Zelllinien identifiziert werden, die aufgrund ihrer endogenen Taps-Expression für Experimente zur Funktion von Taps *in vitro* geeignet sind. Die analysierten Keratinozyten-Zelllinien unterscheiden sich in ihrer Morphologie unter Kulturbedingungen und ihrer Fähigkeit, nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse benigne oder maligne Tumore zu bilden. Zur Verfügung standen „Reb“-Zellen (immortalisierte primäre Mauskeratinozyten), sowie die beiden Zelllinien SP1 und 308, die zu benignen Tumoren führen. Keratinozyten der Zelllinien PMK-R3 und 3P2 bilden maligne Tumore und die subkutane Injektion von Zellen der Zelllinien Peca, PDV und CarB in Nacktmäuse ruft maligne, metastasierende Tumore hervor.

Für die quantitative RT-PCR (RQ-PCR) wurde RNA aus den Zelllinien präpariert, cDNA synthetisiert (von B. Klucky zur Verfügung gestellt) und eine RT-PCR mit *taps*-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Als interner Standard und Maß für Qualität und Quantität der cDNA diente eine gleichzeitig durchgeführte RT-PCR auf *hprt* (Abb. 4.8A). Das Ergebnis der RQ-PCR bestätigte, dass *taps* auf mRNA-Ebene vor allem in den Zelllinien exprimiert wird, die nach Injektion in Nacktmäuse zu benignen und malignen Tumoren führen (SP1 und 308(benigne), PMK-R3 und 3P2 (maligne)) und unter normalen Kulturbedingungen noch eine epitheliale Morphologie aufweisen. In Zelllinien, die in Nacktmäusen aggressive, maligne Tumore bilden und in der Zellkultur eine eher spindelförmige, Fibroblasten-ähnliche Morphologie haben (PDV und CarB) und primären, immortalisierten Keratinozyten (Reb), konnten dagegen nur sehr geringe Mengen *taps*-mRNA nachgewiesen werden.

Die Analyse der Proteinexpression im *Western Blot* mit dem Taps-spezifischen Antikörper zeigte signifikante Mengen an Taps-Protein in den Zelllinien 308, PMK-R3 und 3P2, während in den Zelllinien PDV und CarB nur sehr schwache Signale für Taps detektiert werden konnten (Abb. 4.8B).

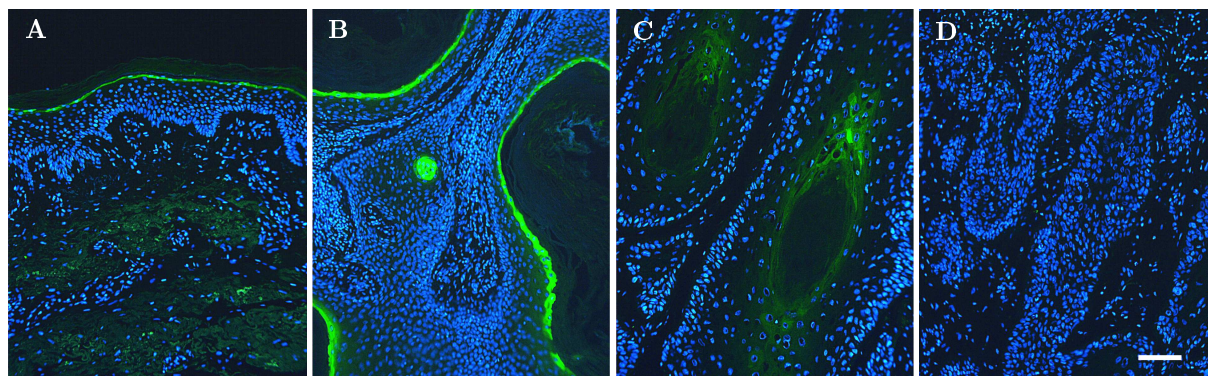
#### 4.5.1 Expression von Taps in humanen Hauttumoren

Um zu klären, ob die Ergebnisse aus der Mehrstufenkarzinogenese der Maushaut auch auf humane Tumore übertragbar sind, wurden indirekte Immunfluoreszenz-Analysen auf



**Abb. 4.8: Taps wird verstärkt in benignen Zelllinien exprimiert.** Die ausgewählten Maus-Keratinocytenzelllinien unterscheiden sich in ihrem Potential, nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse benigne oder maligne Tumore auszubilden. Aus diesen Zelllinien wurden Gesamt-RNA und Zellextrakte präpariert. **A** Eine quantitative PCR auf *tps* mit *hprt* als internem Standard wurde durchgeführt. Die Balken zeigen die Mittelwerte des Experiments, das im Dreifachansatz durchgeführt wurde. Der Standardfehler war so gering, dass Fehlerbalken bei der hier verwendeten Skalierung nicht mehr sichtbar sind. **B** Ein *Western Blot* mit dem polyklonalen Anti-Taps-Antikörper (1:100) zeigt die Proteinexpression in den verwendeten Zelllinien. Derselbe Blot wurde außerdem mit einem polyklonalen anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper (1:2000) inkubiert, um die Menge und Qualität der verwendeten Proteinextrakte zu bestimmen.

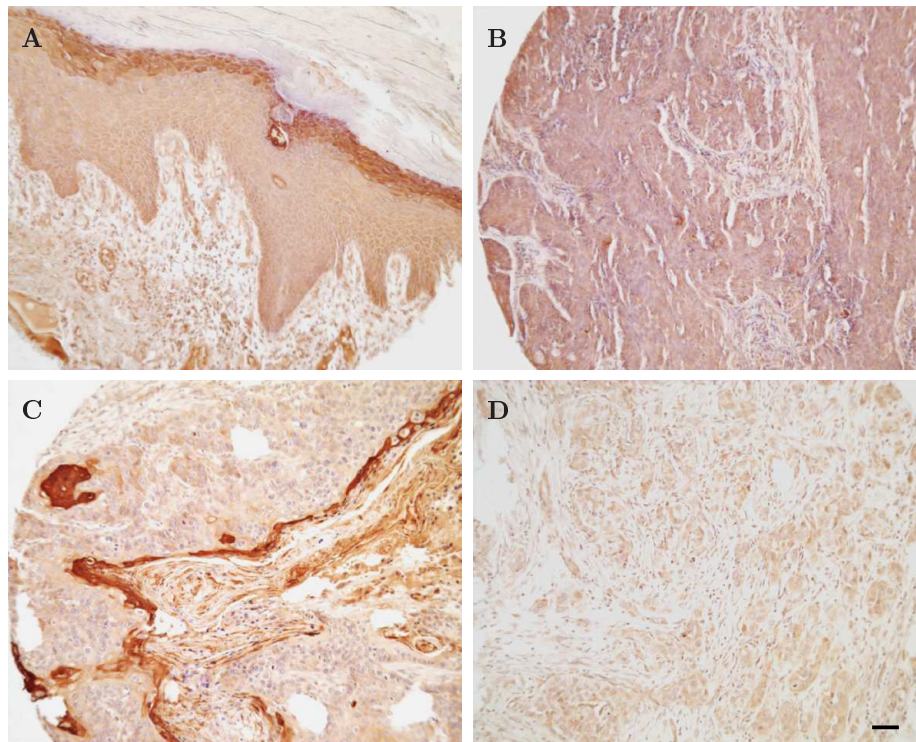
Proben von normaler, an Tumorgewebe grenzender Haut, von Keratoakanthomen und Plattenepithelkarzinomen durchgeführt. Abbildung 4.9 zeigt, dass Taps in normaler Haut in Keratinocyten des *Stratum granulosum* exprimiert wird und ein deutliches Signal in den verhornten Bereichen des Keratoakanthoms und des Plattenepithelkarzinoms sichtbar ist (grüne Fluoreszenz). In unverhornten, dedifferenzierten Arealen des PEK konnte jedoch kein Taps nachgewiesen werden.



**Abb. 4.9: Expression von Taps im humanen Plattenepithelkarzinom.** Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse mit dem polyklonalen Anti-Taps-Antiserum (1:400) zeigte die Expression von Taps-Protein (grünes Signal) im *Stratum granulosum* der normalen Haut, die an das Tumorgewebe angrenzt (**A**), im Keratoakanthom (**B**), sowie in verhornten (**C**), jedoch nicht in unverhornten Bereichen des Plattenepithelkarzinoms (**D**). Die Färbung wurde mit einem Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500, grün) sichtbar gemacht und die Kerne mit H33342 (1  $\mu\text{g/ml}$ , blau) gegengefärbt. Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. (Größenmarker: 100  $\mu\text{m}$ .)

Um zu überprüfen, ob dieses Expressionsmuster von Taps (Abb. 4.9) allgemein gültig ist, wurde die Expressionsanalyse auf eine größere Anzahl von Tumoren ausgeweitet. Es wurden zwei sogenannte Gewebe-*Mikroarrays* (TMAs) in einer immunhistochemischen Analyse mit dem Anti-Taps-Antikörper verwendet, die Proben von 77 Plattenepithelkarzinomen bzw. Gewebeproben normaler Haut (16 Proben), aktinischer Keratosen (32 Proben), von *in situ*-Karzinomen (26 Proben) und von Basaliomen (7 Proben) enthielten.

Die immunhistochemische Färbung der TMAs mit dem Taps-spezifischen Antikörper ergab eine deutliche Färbung differenzierter Zellen der normalen Haut und der aktinischen Keratose, die übrigen Zellen zeigten nur eine sehr geringe Färbung (Abb. 4.10A; weitere Daten nicht gezeigt). Im Basaliom war keine spezifische Färbung für Taps in Tumorealen zu erkennen (Abb. 4.10B). Bei den Plattenepithelkarzinomen (PEK) konnte eine starke Färbung verhornter Zellen im gut differenzierten PEK (Abb. 4.10C) nachgewiesen werden, während in der Tumormaprobe des gering differenzierten PEK keine spezifische Färbung für Taps erkennbar war (Abb. 4.10D). Die hier abgebildeten Beispiele für die unterschiedlichen Tumormaproben sind repräsentativ für alle auf den TMAs vorhandenen Proben eines Tumortyps. Zusammenfassend bestätigen diese Daten, dass eine Taps-Expression



**Abb. 4.10: Expression von Taps in humanen prämaligen und malignen Läsionen der Haut.** Eine immunhistochemische Analyse mit dem polyklonalen Anti-Taps-Antiserum zeigt die Expression von Taps-Protein (dunkelbraunes Signal) im *Stratum granulosum* der aktinischen Keratose (A) und in verhornten Bereichen eines gut differenzierten Plattenepithelkarzinoms (PEK) (C). Im Basaliom (B) und in einem gering differenzierten PEK (D) ist keine spezifische Färbung nachweisbar. Die TMAs wurden nach der immunhistochemischen Färbung mit Hämatoxylin und Eosin zur Visualisierung der Zellkerne und des Zytoplasmas gegengefärbt. (Größenmarker: 50  $\mu\text{m}$ .)

auf gut differenzierte Bereiche der normalen Haut und jener Hautläsionen beschränkt ist, bei denen noch eine Differenzierung der Zellen stattfindet. In gering bis undifferenzierten Bereichen eines PEK oder eines Basalioms kann keine Taps-Expression nachgewiesen werden.

## 4.6 Expression von Taps-Protein in nicht-neoplastischen Hautläsionen

Taps wird den bisherigen Erkenntnissen zufolge in differenzierenden Zellen mehrschichtiger, unverhornter Epithelien, in der Haut und in benignen und malignen Tumoren exprimiert, die noch differenzierte Bereiche aufweisen.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Expression von Taps in Hauttumoren Zeichen einer gestörten Differenzierung und nicht einer neoplastischen Transformation ist, wurden nicht-neoplastische Hautläsionen, bei denen die terminale Differenzierung gestört ist, mittels Immunfluoreszenz-Färbung auf Taps-Expression untersucht. Zu den untersuchten Läsionen gehörten Psoriasis (Schuppenflechte), Lichen ruber, Ekzem und aktinische Keratose. Von mehreren Proben jeden Typs wurden Gewebeschnitte (Paraffin, 10  $\mu\text{m}$ ) hergestellt und zur histologischen Begutachtung mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Darüber hinaus wurden Immunfluoreszenz-Färbungen mit dem Taps-spezifischen Antikörper und einem Cy3-gekoppelten (rot) Sekundärantikörper angefertigt. In allen Hautläsionen zeigte sich eine starke Färbung in Keratinozyten des *Stratum granulosum* (Abb. 4.11B, D, F, H; rote Fluoreszenz). Darüber hinaus konnte bei Psoriasis eine zusätzliche Färbung im *Stratum corneum* nachgewiesen werden (Abb. 4.11B).

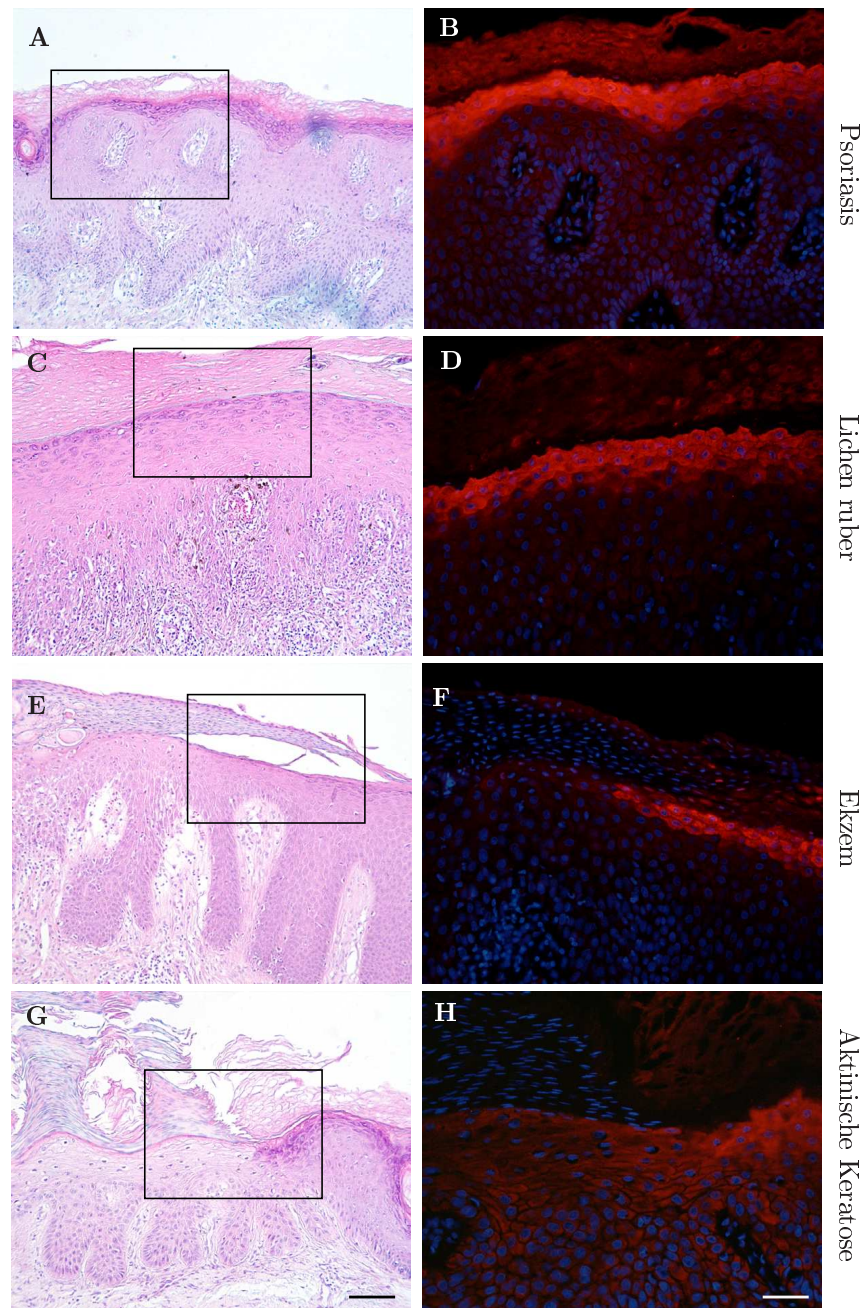
Die Schlussfolgerung aus diesem Experiment ist, dass die Expression von Taps an die Anwesenheit eines histologisch erkennbaren *Stratum granulosum* gekoppelt ist.

## 4.7 Transkriptionelle Regulation der Taps-Expression

Die Expression von Taps wird nach Behandlung der Maushaut mit dem Tumorpromotor TPA stark induziert (s. Abschnitt 4.4.1). Ein Transkriptionsfaktor, der maßgeblich an der Genexpression nach TPA-Behandlung beteiligt ist, ist AP-1 (s. Abschnitt 1.2.1).

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob AP-1 auch an der transkriptionellen Regulation der Taps-Expression nach TPA-Behandlung beteiligt ist, wurde Maus-Rückenhaut mit Azeton (Ko), TPA oder einer Kombination aus TPA und Dexamethason (T+D) behan-





**Abb. 4.11: Expression von Taps in humanen Hautläsionen.** Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse mit dem polyklonalen Anti-Taps-Antiserum (1:400) zeigte die Expression von Taps-Protein (rotes Signal) im *Stratum granulosum* in verschiedenen Hautläsionen wie Psoriasis (**B**), Lichen ruber (**D**), im Ekzem (**F**) und in aktinischer Keratose (**H**). Die Kerne wurden mit H33342 gefärbt ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ , blaues Signal). Die HE-Färbungen (**A**, **C**, **E** und **G**) zeigen eine geringere Vergrößerung des entsprechenden Immunfluoreszenzbildes. Die schwarzen Rechtecke markieren jeweils den Bereich, der in der Immunfluoreszenz vergrößert dargestellt ist. (Größenmarker:  $100\mu\text{m}$  (HE),  $50\mu\text{m}$  (IF)).

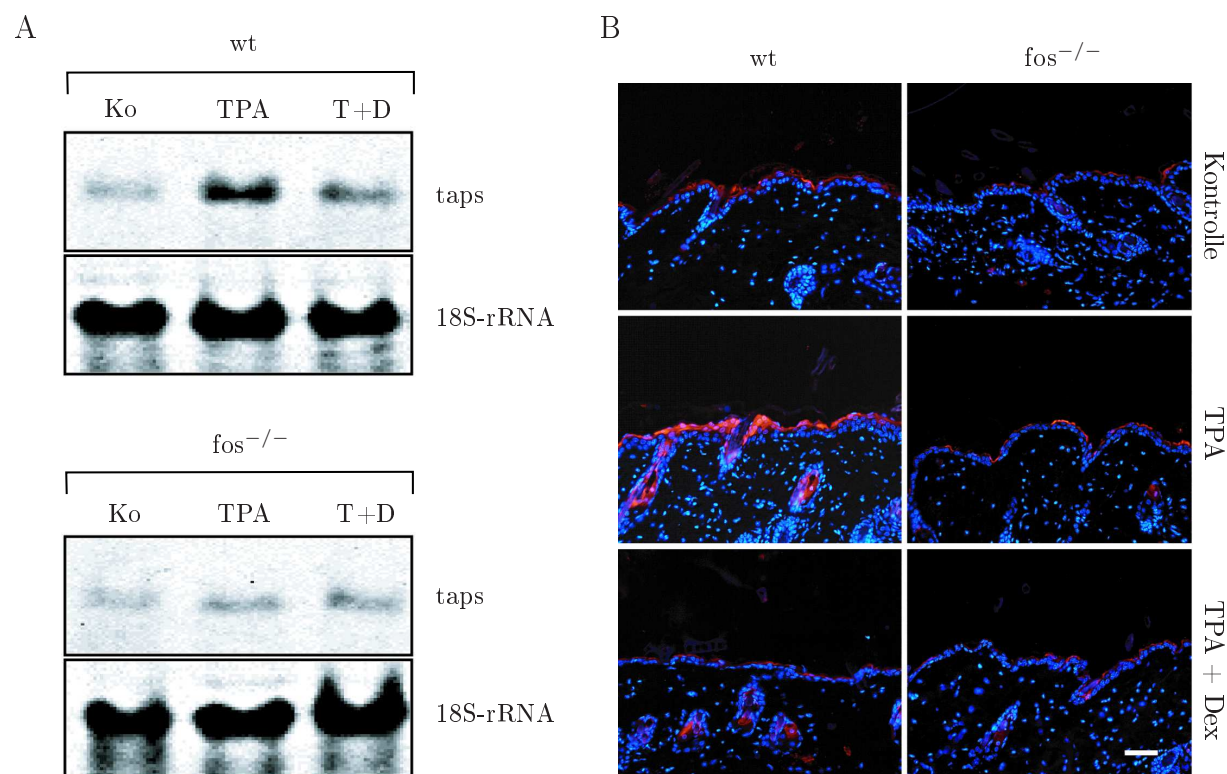
delt. Dexamethason ist ein synthetisches Glukokortikoid, das TPA-induzierte Hyperplasie und Entzündungsreaktionen blockiert, indem es mit der Funktion von AP-1 aber auch anderen Transkriptionsfaktoren interferiert [50],[62].

Die Behandlung der Maushaut mit Azeton führte nicht zu einer Veränderung der basalen Taps-Expression. Die Applikation von TPA und Dexamethason führte zu einer verminderten Induktion von *taps*-mRNA im Vergleich zu einer Behandlung mit TPA allein, was mittels eines *Northern Blots* gezeigt werden konnte (Abb. 4.12A, wt). Dieses Ergebnis lieferte den ersten Hinweis darauf, dass AP-1 an der transkriptionellen Regulation der *taps*-Expression beteiligt sein könnte. Um diese Annahme weiter zu untermauern, wurden c-Fos defiziente Mäuse mit Azeton, TPA bzw. TPA und Dexamethason behandelt. Der anschließend durchgeführte *Northern Blot* mit RNA aus Rückenhaut dieser Mäuse ergab, dass die basale *taps* Expression mit der Expression in Wildtyp-Mäusen vergleichbar war. Eine Induktion der Expression in c-Fos-defizienten Mäusen nach TPA-Behandlung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.12A, fos<sup>-/-</sup>).

Diese Erkenntnisse zur mRNA-Expression wurden mit dem Taps-spezifischen Antikörper und Gewebeschnitten der Rückenhaut in einer indirekten Immunfluoreszenz-Färbung auf Proteinebene verifiziert. Abbildung 4.12B belegt, dass in c-Fos-defizienten Mäusen keine Induktion der Expression nach TPA-Behandlung stattfindet, während bei Wildtyp-Mäusen, die als Kontrolle dienten, eine deutliche Induktion der Expression erkennbar ist (vergl. Abb. 4.12B, TPA). Nach Applikation von TPA und Dexamethason konnte weder in Wildtyp-Mäusen noch c-Fos-defizienten Mäusen eine erhöhte Taps-Expression detektiert werden.

Diese Ergebnisse belegen, dass c-Fos ein AP-1-Mitglied ist, das an der transkriptionellen Regulation der Taps-Expression nach einem TPA-Stimulus beteiligt ist, jedoch keinen Einfluss auf die basale Taps-Expression hat. Dies konnte durch ISH-Analysen mit der Taps-spezifischen Probe auf Gewebeproben (Haut, Zunge, Ösophagus) von Wildtyp- und c-Fos-defizienten Mäusen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Durch eine detaillierte Inspektion der Promotor-Region des *taps*-Gens konnte eine in Mensch und Maus konservierte AP-1-Bindestelle (TRE-Motiv) identifiziert werden.



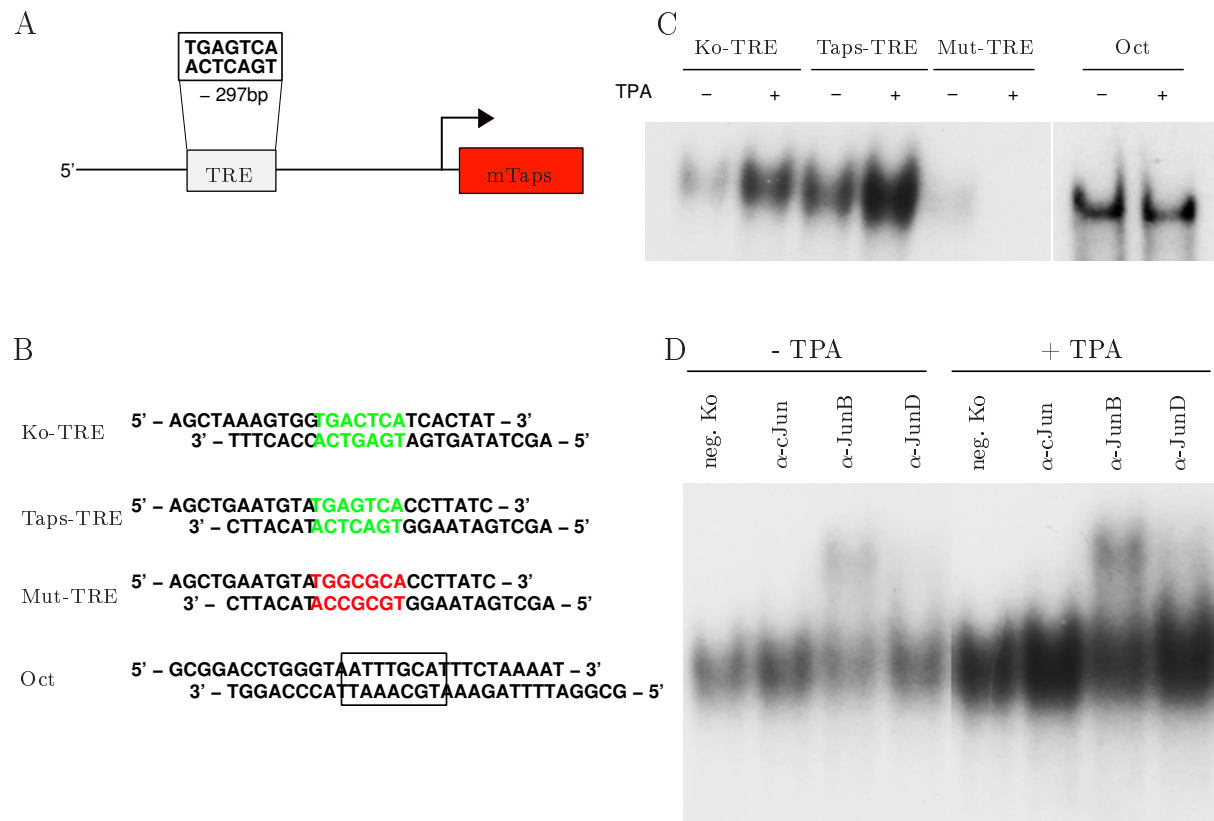
**Abb. 4.12: Taps-Expression nach TPA-Behandlung ist c-Fos-abhängig.** Die Rückenhaut von Wildtyp (wt) und c-Fos-defizienten Mäusen (*fos*<sup>-/-</sup>) wurde mit Azeton (Kontrolle), TPA oder TPA und Dexamethason (TPA + Dex) behandelt. Die Tiere wurden 6 Stunden nach der Behandlung getötet und Hautproben zur RNA-Präparation und *Northern Blot*-Analyse verwendet oder für Paraffinschnitte vorbereitet. **A** Für die Analyse der mRNA-Expression wurde die Gesamt-RNA in einem *Northern Blot* mit einer <sup>32</sup>P-markierten Taps-spezifischen Probe hybridisiert. Als Kontrolle der RNA-Qualität und -quantität diente eine Hybridisierung mit einer spezifischen Probe gegen 18S-rRNA. Dieser *Northern Blot* wurde von Dr. U. Breitenbach zur Verfügung gestellt. **B** Die Schnitte wurden einer indirekten Immunfluoreszenz mit dem Taps-spezifischen Antiserum (1:400) und einem Cy3-gekoppelten Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:500) unterzogen und mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit H33342 (1 $\mu$ g/ml, blau). Der Größenmarker entspricht 50  $\mu$ m.

Im Taps-Promotor der Maus liegt diese potentielle Bindestelle 297 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart (Abb. 4.13 A).

Um festzustellen, ob AP-1-Dimere an das potentielle TRE-Motiv im Taps-Promotor binden, wurde eine Proteinbindungs-Studie (*Electromobility Shift Assay* (EMSA)) mit Kernextrakten aus TPA- und kontrollbehandelten (- TPA) PMK-R3-Keratinocyten durchgeführt. Für den Bindungsassay wurden verschiedene Oligomere verwendet: Ein Kontroll-



TRE aus dem Promotor des murinen *kollagenase-3*-Gens, das identifizierte Taps-TRE, ein mutiertes Taps-TRE (Mut-TRE) und als Kontrolle für die Qualität und Quantität der Kernextrakte ein Oligomer mit der Bindungsstelle für das Oct1-Protein (Oct, 4.13B).



**Abb. 4.13: JunB bindet an eine AP1-Bindestelle im Taps-Promotor.** **A** Schematische Darstellung des murinen Taps-Promotors. Der Promotor enthält eine potentielle AP-1-Bindestelle (TRE) 297 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart. **B** *In vitro*-Proteinbindungs-Assay mit Kernextrakten aus kontroll(-)- und TPA(+)-behandelten PMK-R3-Zellen mit Oligonukleotiden, die die potentielle AP-1-Bindestelle enthalten. Als Positivkontrolle für die Bildung der AP-1-Komplexe dienten Oligonukleotide mit dem TRE aus dem Promotor des Maus-*kollagenase-3*-Gens, als Negativkontrolle dienten Oligonukleotide mit einem mutierten TRE im gleichen Kontext wie bei dem zu testenden TRE. **C** *Supershift-Assay*: Hierbei wurden die Kernextrakte vor der Inkubation mit dem TRE-Primer aus dem murinen Taps-Promotor (s. **B**) mit spezifischen Antikörpern ( $\alpha$ -cJun,  $\alpha$ -JunB,  $\alpha$ -JunD) gegen verschiedene AP-1-Untereinheiten 30 Minuten auf Eis vorinkubiert.

Der durchgeführte *EMSA* bewies durch das Signal in den Spuren des Kontroll-TRE (Ko-TRE) aus dem Promotor der humanen Kollagenase-3, dass bindungsfähige AP-1-Komplexe in den Extrakten vorhanden waren und dass nach TPA-Behandlung eine deut-

liche Induktion der Bindungsaktivität auftritt. Ein vergleichbares Bild ergab sich mit dem potentiellen TRE aus dem Taps-Promotor. Im Gegensatz dazu können an die mutierte AP-1-Bindungsstelle tatsächlich keine AP1-Komplexe mehr binden (Abb. 4.13B).

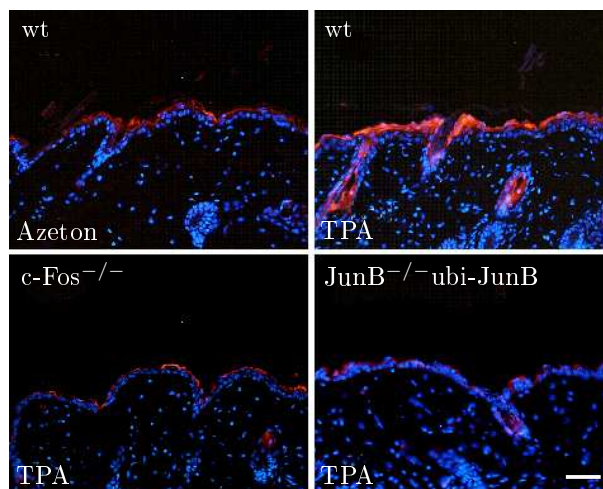
Das Ergebnis des *EMSA* unterstützt also die Hypothese, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 die TPA-induzierte transkriptionellen Regulation von Taps vermitteln kann. Um einen Hinweis auf den Dimerisierungspartner von c-Fos zu erhalten, wurden *Supershift-Assays* mit Kernextrakten von TPA- bzw. kontroll-behandelten PMK-R3-Keratinocyten in Anwesenheit von spezifischen Antikörpern gegen Jun-Untereinheiten (c-Jun, JunB und JunD) durchgeführt. Die Bindung eines Antikörpers an den TRE-AP-1-Komplex bewirkt dabei eine veränderte Wanderung des TRE-AP-1-Komplexes im Gel.

Mit dieser Methode konnte nachgewiesen werden, dass JunB im AP-1-Komplex am Taps-TRE enthalten ist. Im Gegensatz dazu konnte eine Beteiligung von JunD oder c-Jun nicht detektiert werden (Abb. 4.13C).

Somit scheint die TPA-induzierte Taps-Expression in Keratinocyten hauptsächlich über c-Fos/JunB-Dimere vermittelt zu werden.

Für den Nachweis der Beteiligung von JunB an der TPA-induzierten Taps-Expression *in vivo* wurden JunB<sup>-/-</sup>-ubi-JunB-Mäuse [114, 115] verwendet. In dieser Mauslinie wird die embryonale Letalität des JunB-*knockouts* durch die Expression eines JunB-Transgens unter der Kontrolle des humanen Ubiquitin C-Promotors kompensiert. Im adulten Gewebe der Maus ist der Ubiquitin-Promotor in einigen Geweben, u.a. der Haut, fast vollständig inaktiv, so dass diese Gewebe dann nur minimale JunB-Mengen aufweisen. Die Rückenhaut dieser Mäuse wurde mit TPA behandelt, sechs Stunden nach der Applikation präpariert, fixiert und in Paraffin eingebettet.

In einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse wurden Gewebeschnitte einer Wildtyp-Maus (Azeton-behandelt und sechs Stunden nach TPA), einer c-Fos-defizienten Maus (sechs Stunden nach TPA) und der JunB<sup>-/-</sup>/ubiJunB-Maus (sechs Stunden nach TPA) mit dem Taps-spezifischen Antikörper inkubiert. Die Analyse der Färbungen zeigte erneut die geringe basale Taps-Expression in der Haut der unbehandelten Wildtyp-Maus und die deutliche Induktion der Taps-Expression nach Applikation von TPA (Abb. 4.14,



**Abb. 4.14: Taps-Expression nach TPA-Behandlung in Fos ( $\text{fos}^{-/-}$ )- und JunB ( $\text{junB}^{-/-}$  ubi-JunB)-defizienten Mäusen** Wildtyp (wt)-, c-Fos-defiziente ( $\text{fos}^{-/-}$ ) und JunB-defiziente ( $\text{junB}^{-/-}$  ubi-JunB) Mäuse wurden mit TPA behandelt und die Rückenhaut 6 Stunden nach der Behandlung präpariert. Die Haut wurde in Paraffin eingebettet und 6  $\mu\text{m}$ -dicke Gewebeschnitte hergestellt. Eine indirekte Immunfluoreszenz-Färbung mit dem Taps-spezifischen Antiserum wurde durchgeführt wie in Abb. 4.6 beschrieben. Als Kontrolle diente die kontrollbehandelte Rückenhaut einer Wildtyp-Maus. Der Größenmarker entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

obere Reihe). Die Stärke des Immunfluoreszenz-Signals in c-Fos-defizienter Haut nach TPA-Behandlung bestätigte die zuvor bereits beschriebene fehlende Induktion der Taps-Expression in diesen Mäusen (s. Abb. 4.12). Abbildung 4.14 macht auch deutlich, dass in JunB-defizienten Mäusen ( $\text{JunB}^{-/-}$  ubi-JunB) nach TPA-Behandlung keine Verstärkung der Taps-Expression über das basale Niveau heraus erfolgt.

Dieses Experiment belegt, dass *in vivo* JunB neben c-Fos an der TPA-induzierten Taps-Expression in der Haut beteiligt ist.

## 4.8 Expression von Taps-Varianten

Taps wird in verschiedenen Varianten intra- und extrazellulär exprimiert [99], deren Entstehung bisher ungeklärt war. Da das *taps*-Gen keine Introns enthält, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Spleißvarianten handelt. Es war ebenfalls bekannt, dass im offenen Leseraster von *taps* ein zweiter potentieller Translationsstart vorhanden ist. Um zu überprüfen, ob eine der detektierten Varianten durch Verwendung dieses alternati-

ven Startkodons entsteht, wurde ein Expressionsplasmid kloniert, welches das offene Leseraster von *taps* ab dem potentiellen zweiten Translationsstart enthält (hTaps $\Delta$ ATG1). Anschließend wurden HT1080-Zellen transient mit den Vektoren pcDNA3.1-hTaps und pcDNA3.1-hTaps $\Delta$ ATG1 (Abb. 4.15 A) transfiziert. In beiden Vektoren ist das offene Leseraster für Taps an einen Myc/His-*tag* gekoppelt und steht unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors. Als Kontrolle wurden HT1080-Zellen mit einem pcDNA3.1-Leervektor transfiziert.

Der Nachweis der Taps-Expression in HT1080-Zellen erfolgte durch *Western Blot*-Analyse. Hierfür wurden Zellextrakte und Kulturüberstände der transfizierten Zellen einer Affinitätschromatographie unterzogen, bei welcher der an Taps gekoppelte Polyhistidin-*tag* an Kobaltionen bindet, die an einen immobilisierten Chelator gebunden sind (*Talon-beads*). Durch diese Affinitätschromatographie konnte Taps über den His-*tag* aufgereinigt und die verschiedenen Varianten im *Western Blot* über den Myc-*tag* mit Hilfe eines monoklonalen Anti-Myc-Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. 4.15B).

Der *Western Blot* zum Nachweis von Taps in Zellextrakten und Kulturüberständen zeigte Taps-spezifische Banden in den Proben der mit pcDNA3.1-hTaps und pcDNA3.1-hTaps $\Delta$ ATG1 transfizierten Zellen, nicht jedoch in der Leervektor-Kontrolle. In den Zellextrakten konnten für hTaps drei spezifische Banden unterschiedlicher Größe identifiziert werden, für hTaps $\Delta$ ATG1 jedoch nur eine Bande (\*). Ein Vergleich mit dem Größenstandard ergab für die größte Bande ein Molekulargewicht von ca. 49 kDa (hTaps49), für die mittlere Bande ein Molekulargewicht von ca. 43 kDa (hTaps43) und für die kleinste Bande ein Gewicht von ca. 37 kDa (hTaps37). Die kleinste Variante wurde als einzige in den pcDNA3.1-hTaps $\Delta$ ATG1 transfizierten Zellen detektiert. Im Überstand der hTaps-transfizierten Zellen konnten zwei Varianten nachgewiesen werden: Eine Bande von ca. 47 kDa (hTaps47) und eine Bande von ca. 37 kDa (hTaps37). Für hTaps $\Delta$ ATG1 war auch hier nur die Variante hTaps37 detektierbar (Abb. 4.15C).

Dieses Experiment bestätigte die Hypothese, dass Taps37 durch die Proteinsynthese an einem alternativen Translationsstarts gebildet wird. Dies wurde zusätzlich bestätigt durch Transfektionsexperimente mit einem Expressionsplasmid, in dem der zweite Trans-

lationsstart im offenen Leseraster für *taps* mutiert wurde. Die damit transfizierten Zellen exprimieren keine hTaps37-Variante (B. Hartenstein, persönliche Mitteilung).

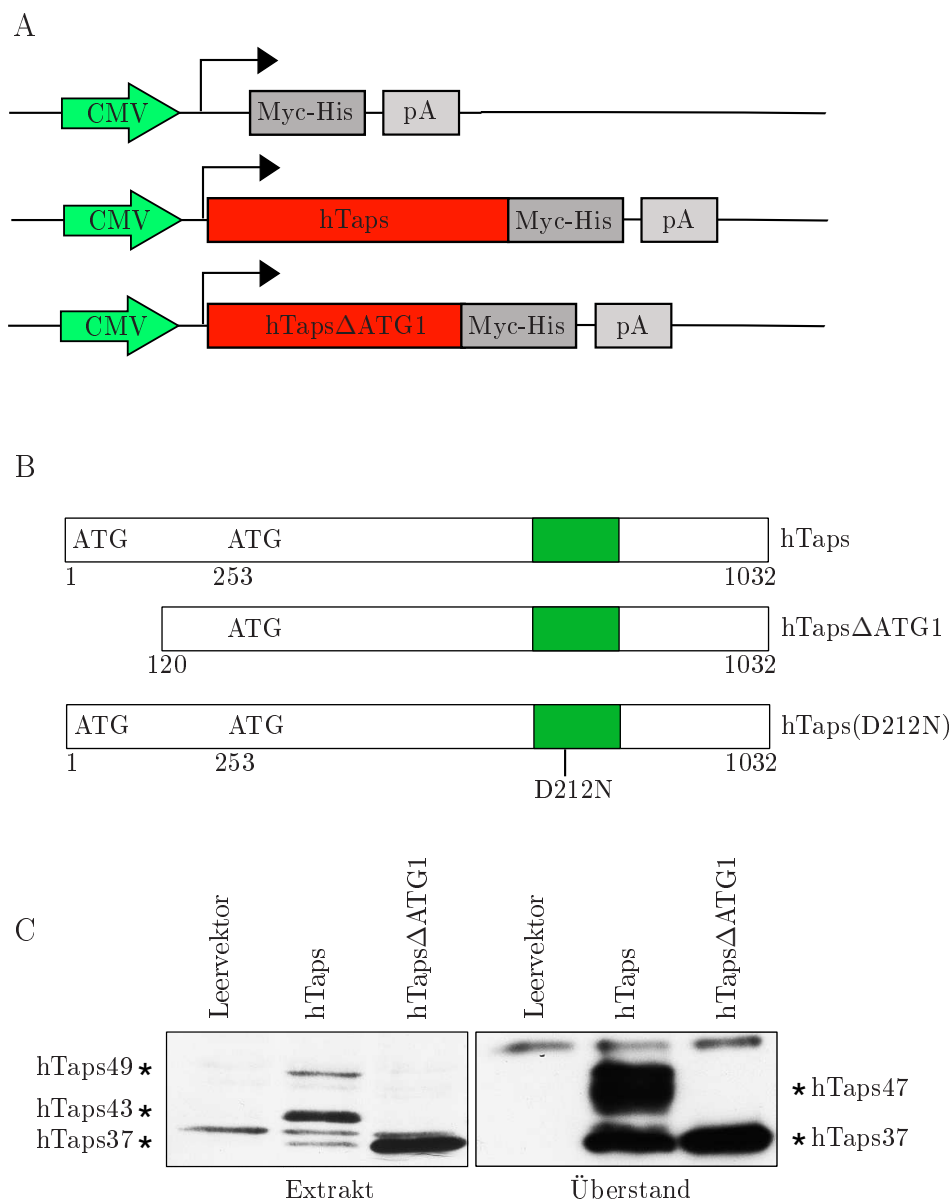
In transienten Transfektionen von HeLa- und HEK293-Zellen mit den Konstrukten, die das offene Leseraster für humanes bzw. murines Taps (hTaps bzw. mTaps) beinhalten, konnten die Ergebnisse zur Taps-Expression in HT1080-Zellen überprüft und bestätigt werden. Darüber hinaus konnten in diesen Epithelzellen zwei weitere Varianten von 28 kDa (Taps28) und 14 kDa (Taps14) Molekulargewicht detektiert werden. Dabei wurde außerdem deutlich, dass in hTaps $\Delta$ ATG1-transfizierten Zellen präferentiell die Variante Taps14 gebildet wird (Abb. 4.16).

## 4.9 Taps ist eine funktionelle Aspartylprotease

Aufgrund der bereits genannten Sequenzhomologie (vergl. Abschnitt 4.1) wurde vermutet, dass Taps eine funktionelle Aspartylprotease sein könnte. Für andere eukaryontische und retrovirale Aspartylproteasen wie z.B. Cathepsin D und die HIV-Protease ist die Bildung verschiedener Varianten durch Autoproteolyse beschrieben [20, 130]. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob auch im Falle von Taps einige der genannten Proteinvarianten durch Autoproteolyse entstehen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine Taps-Mutante kloniert, bei der durch gezielten Austausch der Aminosäure Aspartat im aktiven Zentrum der Protease eine proteolytisch inaktive Variante entsteht.

Zur Generierung einer proteolytisch inaktiven Mutante von Taps wurde in einer PCR-Reaktion aus der Sequenz für humanes Taps mit Oligonukleotiden (*Primer*) ein Fragment amplifiziert, bei dem durch die Wahl der *Primer* die Basensequenz durch den Austausch zweier Basen verändert wurde. Das PCR-amplifizierte Fragment ersetzte im pcDNA3.1-hTaps-Vektor den Teil der Sequenz, in dem der kodierende Bereich für das aktive Zentrum liegt. Der Austausch der beiden Basen führte bei Translation dieser mRNA zu einem Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum: Aspartat wurde durch Asparagin ersetzt (hTaps(D212N)) (s. Abb. 4.15B, unten).

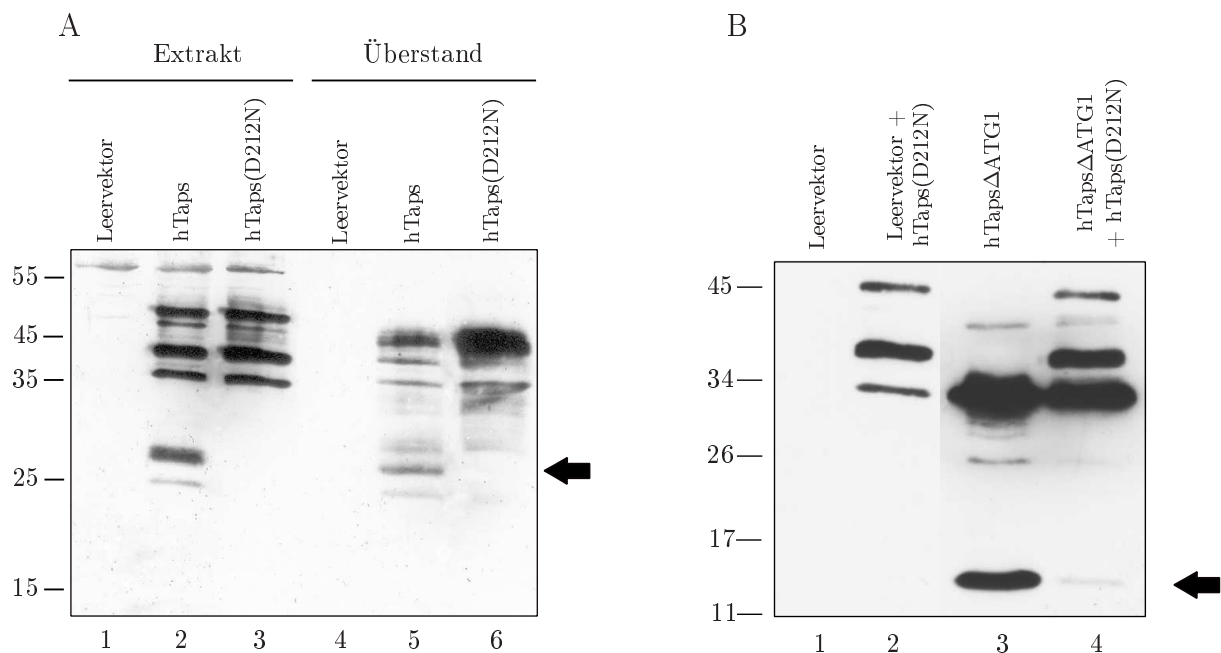


**Abb. 4.15: HT1080-Fibrosarkomzellen exprimieren drei intrazelluläre und eine extrazelluläre Variante von Taps.** **A** HT1080-Zellen wurden mit drei verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert: Einem Leervektor (pcDNA3.1-Myc/His(C), oben), einem hTaps-Vektor, der das offene Leseraster von Taps enthält (pcDNA3.1-hTaps-Myc/His, Mitte) und einem hTapsΔATG1-Vektor (pcDNA3.1-hTapsΔATG1-Myc/His, unten), dessen Leseraster erst am zweiten Startkodon beginnt. **B** Die oberen beiden Schemazeichnungen zeigen die erwarteten Proteinvarianten für hTaps und hTapsΔATG1 mit der als grüne Box markierten Proteasedomäne. Das untere Schema zeigt die proteolytisch inaktive Taps-Mutante hTaps(D212N). Die Kennzeichnung „D212N“ markiert die Stelle des Aminosäureaustauschs von Aspartat zu Asparagin. **C** Für den *Western Blot* wurden Zellextrakte und Kulturüberstände mit *Talonbeads* inkubiert, um rekombinantes Taps anzureichern. Die Membran wurde mit einem monoklonalen Anti-Myc-Antikörper (1:2000) inkubiert.

Um herauszufinden, ob die Mutante hTaps(D212N) proteolytisch inaktiv ist, wurden HeLa-Zellen transient mit den Expressionsplasmiden für hTaps und hTaps(D212N) (Abb. 4.15A und B) transfiziert. Als Kontrolle diente der pcDNA3.1-Leervektor. Von den transfizierten Zellen wurden Extrakte hergestellt, die ebenso wie die Zellkulturüberstände affinitätschromatografisch aufgereinigt und im *Western Blot* analysiert wurden. Zur Detektion diente hier der Anti-Taps-Antikörper (s. Abschnitt 4.2). Auf dem *Blot* wurden durch den Antikörper in dem Extrakt und dem Überstand der hTaps-transfizierten Zellen alle bekannten Taps-Varianten detektiert. Im Extrakt der mit der Mutante hTaps(D212N) transfizierten Zellen konnten die Varianten hTaps49, hTaps43 und hTaps37, nicht jedoch die Variante hTaps28, nachgewiesen werden. Im Überstand dieser Zellen war ein starkes Signal für hTaps47 und schwächere Signale für hTaps43 und hTaps37 detektierbar. Auch hier konnte die hTaps28-Variante nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.16 A). Durch dieses Experiment konnte also gezeigt werden, dass die proteolytisch inaktive Taps-Mutante hTaps(D212N) die hTaps28-Variante nicht bilden kann. Demnach handelt es sich bei Taps um eine funktionell aktive Aspartylprotease, deren Protein-Varianten hTaps28 und hTaps14 durch Autoproteolyse entstehen können.

Taps muss, ähnlich den retroviralen Aspartylproteasen, dimerisieren, um eine funktionsfähige Protease mit zwei Proteasedomänen im aktiven Zentrum zu bilden. Eine solche Dimerisierung von Taps konnte bereits mit mehreren säulenchromatografischen Experimenten bestätigt werden ([99] und Daten nicht gezeigt). Um herauszufinden, ob die Expression des mutierten Taps die autoproteolytische Aktivität von Taps inhibieren kann und damit dominant-negativ wirkt, wurden HEK293-Zellen transient mit Leervektor alleine, Leervektor und hTaps(D212N), hTaps $\Delta$ ATG1 alleine oder hTaps $\Delta$ ATG1 und hTaps(D212N) transfiziert. Eine solche Hemmung wäre denkbar, wenn in der Zelle Dimere aus mutiertem und funktionsfähigem Taps gebildet werden.

Im *Western Blot* mit affinitätschromatografisch gereinigten Extrakten konnte in Zellen, die nur mit hTaps $\Delta$ ATG1 transfiziert wurden, ein deutliches Signal für die hTaps14-Variante nachgewiesen werden. In Zellen, die mit einer Kombination aus hTaps $\Delta$ ATG1 und der Mutante hTaps (D212N) (1:1) transfiziert wurden, ist hTaps14 kaum noch de-



**Abb. 4.16: Nachweis der Proteaseaktivität von Taps.** **A** *Western Blot* mit Proteinextrakten und Überständen von transient transfizierten HEK293-Zellen nach *Talonbead*-Inkubation. Transfiziert wurden der Leervektor (1 und 4), hTaps (2 und 5) und hTaps(D212N) (3 und 6), die Mutante, bei der das Aspartat in der Protease-Domäne des Proteins gegen Asparagin ausgetauscht wurde. Die verschiedenen Taps-Varianten wurden mit dem Anti-Taps-Antikörper (1:100) detektiert. **B** *Western Blot* mit Proteinextrakten von transient transfizierten HEK293-Zellen. Hier wurden der Leervektor oder der hTapsΔATG1-Vektor jeweils alleine oder in Kombination mit dem hTaps(D212N)-Vektor transfiziert. Die Extrakte wurden mit *Talonbeads* aufgereinigt und die Taps-Varianten mit dem Anti-Taps-Antikörper (1:100) nachgewiesen.

tektierbar (Abb. 4.16B).

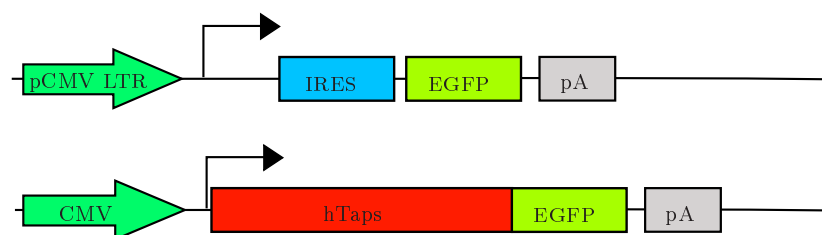
Dieses Experiment liefert den Nachweis dafür, dass es sich bei der hTaps(D212N)-Mutante tatsächlich um eine dominant-negative Mutante handelt.

## 4.10 Lokalisation von Taps-Protein in Epithelzellen

Aufschluss über die intrazelluläre Lokalisation von Taps und damit Hinweise auf eine mögliche Funktion dieser Protease sollte ein hTaps-EGFP-Fusionsprotein liefern. Für dieses Fusionsprotein wurde die kodierende Sequenz von hTaps in einen EGFP-Expressionsvektor kloniert. In einem Pilotexperiment wurden HEK293-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit diesem Expressionsplasmid transfiziert. Als Kontrolle diente der Vektor pMSCV-



IRES-EGFP, durch den EGFP allein in den Zellen exprimiert wird (Abb. 4.17). 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit Mo-wiol auf Objektträgern eingedeckt. Die Analyse der Lokalisation erfolgte an einem *Laser-Scanning*-Mikroskop. Hierbei konnte für hTaps-EGFP eine Lokalisation an der Zellmembran und in intrazellulären Strukturen nachgewiesen werden. Im Nukleus konnte hingegen kein Taps-EGFP-Signal detektiert werden. EGFP alleine war diffus in der Zelle verteilt und an keine spezielle zelluläre Struktur gebunden (Abb. 4.18A).



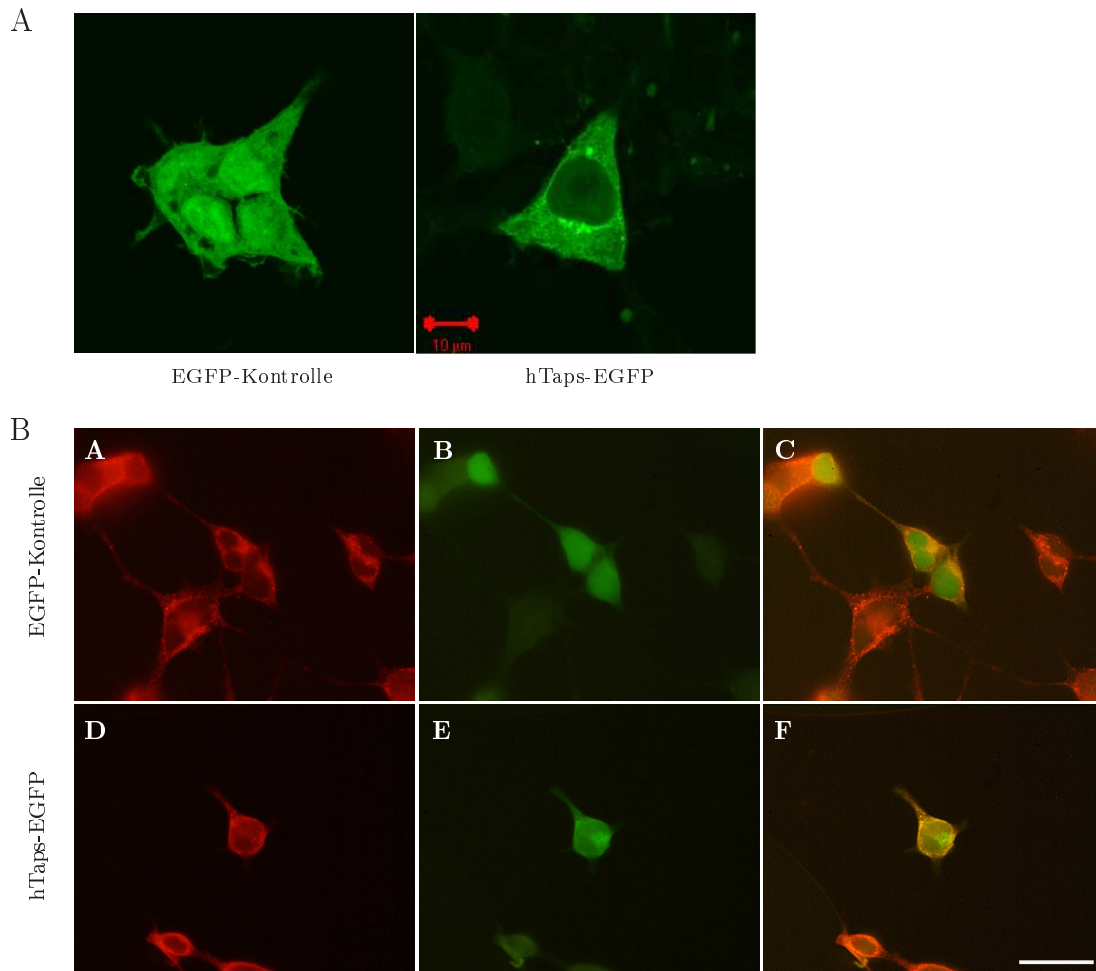
**Abb. 4.17: Taps-EGFP-Expressionsplasmide.** Zur Analyse der intrazellulären Lokalisation dienten Plasmide, über die ein Taps-EGFP-Fusionsprotein (hTaps-EGFP oder hTaps $\Delta$ ATG1-EGFP) exprimiert werden konnte. Als Kontrolle diente bei diesen Experimenten ein pMSCV-IRES-EGFP-Vektor, bei dem EGFP (EGFP-Kontrolle) allein exprimiert wird.

Um die Identität der zellulären Struktur, in welcher Taps intrazellulär lokalisiert ist, zu analysieren, wurden Taps-EGFP-transfizierte Zellen indirekten Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen verschiedene zelluläre Proteine, die spezifisch für bestimmte Kompartimente sind, unterzogen.

Die indirekten Immunfluoreszenz-Analyse mit einem polyklonalen Antikörper gegen die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierte Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und einem Cy3-gekoppelten Anti-Ziege-Sekundärantikörper ließ das ER als rotes Signal im Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden (Abb. 4.18B). Die Einzelaufnahmen der Immunfluoreszenz auf PDI (a und d) und der Fluoreszenz von EGFP bzw. hTaps-EGFP (b bzw. e) wurden elektronisch übereinandergelegt (c und f). Das Ergebnis zeigt, dass hTaps-EGFP im gleichen Kompartiment der Zelle, dem Endoplasmatischen Retikulum, lokalisiert ist wie die Protein-Disulfid-Isomerase. In der entsprechenden Aufnahme (f) wird ein deutliches gelbes Signal als Zeichen der Ko-Lokalisation in der Zelle erkennbar. In kontroll-transfizierten Zellen wird durch die elektronische Überlagerung des grünen

(EGFP) und des roten (PDI) Signals nur ein leicht diffuses gelbliche Signal sichtbar, das kein Zeichen einer Ko-Lokalisation ist. Für Marker gegen Mitochondrien- und lysosomale Proteine konnte keine Ko-Lokalisation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Taps ist demzufolge intrazellulär an der Zellmembran und im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert.



**Abb. 4.18: Lokalisation von hTaps-EGFP in HEK293-Zellen.** **A** In transient mit hTaps-EGFP-Expressionsplasmiden transfizierten HEK293-Zellen wurde die Lokalisation von EGFP (links) bzw. hTaps-EGFP mit Hilfe eines *Laser-Scanning*-Mikroskops dokumentiert. (Größenmarker: 10  $\mu\text{m}$ ) **B** EGFP- bzw. hTaps-EGFP-exprimierende HEK293-Zellen (**a-c** bzw. **d-f**) wurden in einer indirekten Immunfluoreszenz-Analyse mit einem Antikörper gegen PDI (1:50) inkubiert. Die Detektion von PDI erfolgte durch einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500) (**a** bzw. **d**, rot). Die Lokalisation von EGFP bzw. hTaps-EGFP (grün) in denselben Zellen zeigen die Bilder **b** und **e**, die Bilder **c** und **f** die Addition beider Fluoreszenzen. (Größenmarker: 25  $\mu\text{m}$ )

## 4.11 Etablierung Taps-überexprimierender Mauskeratinozyten

Für funktionelle Untersuchungen zum Einfluss einer Taps-Überexpression auf verschiedene zellbiologische Parameter wurde die Keratinozyten-Zelllinie MCA3D, die endogen nur sehr wenig Taps exprimiert, stabil mit den Expressionsplasmiden für hTaps und hTaps $\Delta$ ATG1 transfiziert.

Zur Herstellung konstitutiv Taps-exprimierender Keratinozyten wurden diese mit den entsprechenden Expressionsvektoren (pcDNA3.1-Leervektor, pcDNA3.1-hTaps, pcDNA3.1-hTaps $\Delta$ ATG1; Abb. 4.19A) transfiziert und anschließend selektioniert. Nach der Selektion wurden einzelne Klone etabliert und die stabile Integration der Plasmide ins Genom über eine *Southern Blot*-Analyse überprüft (J. Hess, persönliche Mitteilung).

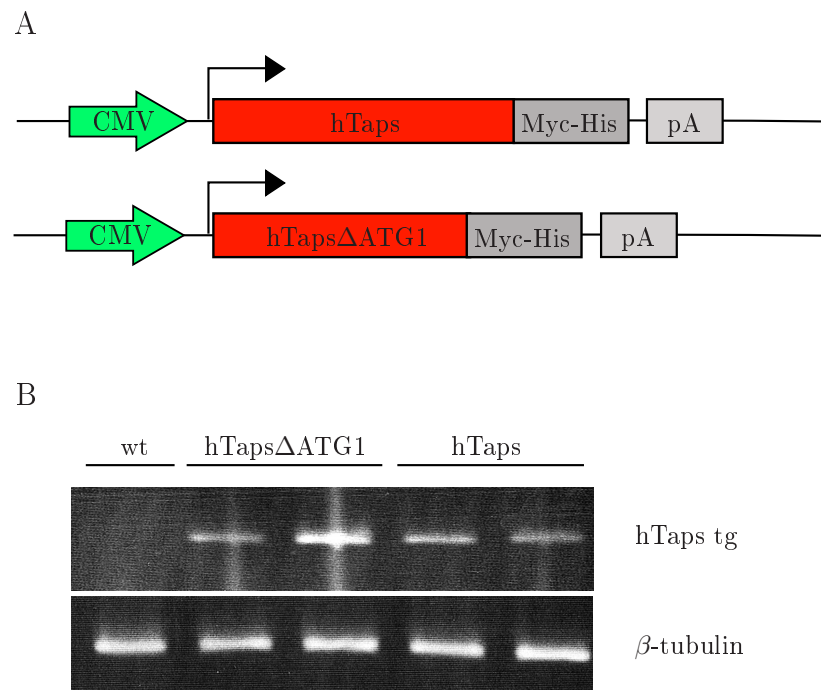
In einer RT-PCR-Analyse wurden einzelne Klone auf ihre Expression des Taps-Konstrukts untersucht. In dieser Analyse konnte durch die Verwendung von Oligonukleotiden für exogenes Taps nachgewiesen werden, dass alle verwendeten Klone mRNA für hTaps-Myc/His bzw. hTaps $\Delta$ ATG1-Myc/His exprimieren.

Jeweils zwei Zell-Klone, die im *Western Blot* die stärkste Taps-Expression gezeigt hatten, wurden für Experimente verwendet, die den Einfluss von Taps auf verschiedene zelluläre Prozesse aufklären sollten.

## 4.12 Einfluss der Taps-Expression auf zelluläre Prozesse

Die durchgeführten Analysen der Proliferation und der Migration ergaben in Taps- sowie Taps $\Delta$ ATG1-überexprimierenden Keratinozyten keinen Unterschied im Vergleich zu Leervektor-transfizierten und Wildtyp-Zellen (Daten nicht gezeigt). die Expression von Taps hat demzufolge keine Auswirkung auf diese beiden zellbiologischen Parameter.

In logarithmisch wachsenden Zellen konnte in den Taps-transfizierten MCA3D-Keratinozyten eine veränderte Morphologie der Zellen festgestellt werden. Kontrollzellen zeigten



**Abb. 4.19: Expression von Taps-mRNA in stabil transfizierten MCA3D-Mauskeratinozyten.** **A** MCA3D-Keratinozyten wurden mit den Expressionsplasmiden für humanes Taps (hTaps, oben) bzw. humanes Taps mit mutiertem erstem Startkodon (hTaps $\Delta$ ATG1, unten) transfiziert und durch Behandlung mit dem Antibiotikum G418 (Neomycin) auf die Zellen selektiert, die das Plasmid stabil in ihr Genom integriert hatten. **B** RT-PCR auf cDNA von Wildtyp-MCA3D, sowie stabil hTaps- und hTaps $\Delta$ ATG1-transfizierte MCA3D-Keratinozyten. Die PCR zeigt durch die Wahl der Oligonukleotide spezifisch die Expression von exogenem Taps (hTaps tg).

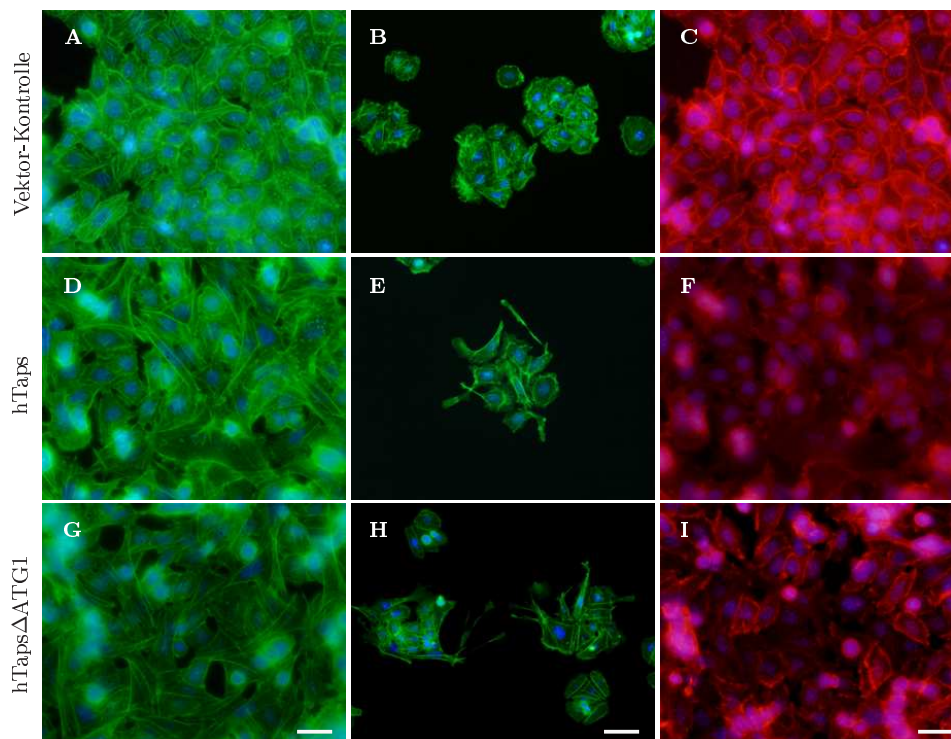
eine flache, epitheliale Morphologie und wuchsen als eine homogene Zellschicht mit zahlreichen Zell-Zell-Kontakten. Taps- und Taps $\Delta$ ATG1-exprimierende Zellen hingegen waren spindelförmig, bildeten weniger Zell-Zell-Kontakte zu benachbarten Zellen aus und wuchsen übereinander (Daten nicht gezeigt). Eine Phalloidin-Färbung von 100% konfluenten Zellen verdeutlichte den Phänotyp Taps-exprimierender Zellen: Während Leervektor-transfizierte Zellen, die Konfluenz erreichen, sehr dicht gepackt nebeneinander auf dem Glaspüttchen wachsen und dabei immer kleiner werden (Abb. 4.20A), wuchsen Taps-transfizierte Zellen über Nachbarzellen hinweg (Abb. 4.20D, G).

Dieser Phänotyp wurde in klonal wachsenden Zellen besonders deutlich. 72 Stunden nach dem Aussäen der Zellen auf Deckgläschen wurden die Klone mit Paraformaldehyd fi-

xiert und das Zytoskelett mit Alexa488-gekoppeltem Phalloidin sichtbar gemacht. Bei der Auswertung im Fluoreszenzmikroskop war zu erkennen, dass Leervektor-transfizierte Zellen in Kolonien wuchsen (Abb. 4.20B), in denen bereits mikroskopisch ein enger Kontakt zwischen Nachbarzellen sichtbar wurde. Taps-exprimierende Zellen dagegen bildeten innerhalb eines Klon verstärkt Filopodien aus und entfernten sich von ihren Nachbarzellen (Abb. 4.20E, H).

Der fehlende Kontakt zwischen Taps-exprimierenden Zellen könnte durch einen Defekt in der Zelladhäsion, die durch E-cadherin vermittelt wird, erklärt werden. Zur Analyse der Zelladhäsion wurde auf denselben konfluenten Zellen eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse mit einem polyklonalen Antikörper gegen E-cadherin durchgeführt. In dieser Färbung wurde in Kontroll-transfizierten Keratinozyten E-cadherin an der Zellmembran detektiert (rote Fluoreszenz, Abb. 4.20 C). Im Gegensatz dazu ist E-cadherin in Taps-exprimierenden Keratinozyten in der überwiegenden Zahl der Zellen eher zytoplasmatisch als membranständig lokalisiert (Abb. 4.20F, I). Dies legt den Schluss nahe, dass in Taps- und Taps $\Delta$ ATG1-exprimierenden Zellen die Zelladhäsion durch eine veränderte Lokalisation von E-cadherin verringert ist. In allen bisher genannten Experimenten war der beobachtete Effekt in Taps $\Delta$ ATG1-exprimierenden Zellen etwas stärker als in Taps-exprimierenden Keratinozyten, so dass für die nachfolgenden Analysen bevorzugt Taps $\Delta$ ATG1-exprimierende Klone verwendet wurden.

Die verringerte Menge an E-cadherin in den Zellmembranen Taps-überexprimierender Zellen warf die Frage auf, ob nur die Lokalisation von E-cadherin an der Membran verändert ist oder ob die Expression von Taps eine verminderte Bildung von E-cadherin in den Zellen bewirkt. Diese Frage konnte mit Hilfe einer *Western Blot*-Analyse beantwortet werden. Zellextrakte von Kontrollzellen (MCA3D wt), Leervektor-transfizierten Zellen und zwei Klonen, die hTaps $\Delta$ ATG1 stabil überexprimierten, wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Der *Blot* wurde anschließend mit einem polyklonalen Anti-E-cadherin-Antikörper inkubiert. Auf der Höhe von 110 kDa wurde in Extrakten aus Taps-exprimierenden Zellen eine etwa gleiche Menge an E-cadherin detektiert (Abb. 4.21, obere dicke Bande) wie in Kontroll- und Leervektor-transfizierten Zellen. Da die Zell-Zell-Adhäsion über E-cadherin

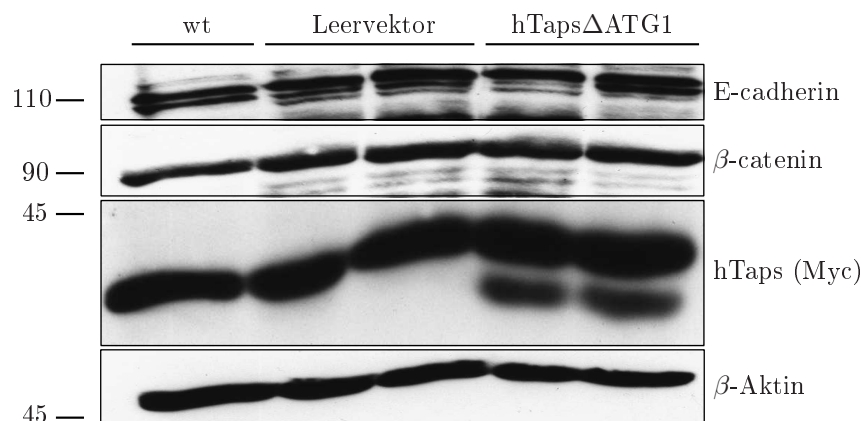


**Abb. 4.20: Exogene Taps-Expression bewirkt ein verändertes klonales Wachstum und verminderte E-cadherin-Expression in den Zellmembranen.** Taps-exprimierende MCA3D-Keratinozyten wurden auf Deckgläschen ausgesät und einer Phalloidin-Färbung (**A**, **B**, **D**, **E**, **G** und **H**, 1:40, grünes Signal) bzw. einer indirekten Immunfluoreszenz-Färbung gegen E-cadherin (**C**, **F** und **I**, 1:200, rotes Signal) unterzogen. Die Detektion von E-cadherin erfolgte mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500). Zur Visualisierung der Kerne wurden die Zellen mit H333342 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , blau) gegengefärbt. (Größenmarker: 50  $\mu\text{m}$  in den Bildern **A**, **D** und **G** und 25  $\mu\text{m}$  in den Bildern **B-C**, **E-F** und **H-I**).

auch von einer Bindung des E-cadherin-Proteins an  $\beta$ -catenin abhängig ist, wurde die Expression dieses Proteins auf derselben Membran mit einem polyklonalen Anti- $\beta$ -catenin-Antikörper getestet. Auch die Expression von  $\beta$ -catenin war diesem *Blot* zufolge in den Taps-exprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollen nicht verändert (Abb. 4.21).

### 4.13 Generierung einer Taps-transgenen Mauslinie

Wie in vorangegangenen Abschnitten (Abschnitte 4.3, 4.5.1, 4.6) bereits dargelegt wurde, wird Taps endogen spezifisch in mehrschichtigen unverhornten Epithelien, Keratinozyten der Haut, Haarfollikeln und Talgdrüsenzellen exprimiert. Die Expression konnte aus-



**Abb. 4.21: Die E-cadherin-Gesamtmenge ist in Taps-transfizierten Zellen unverändert gegenüber Wildtyp-Zellen.** *Western Blot* mit Proteinextrakten aus MCA3D-Wildtyp-Zellen (MCA3D wt), Leervektor-transfizierten Zellen und hTaps $\Delta$ ATG1-überexprimierenden Zellen. Die Membran wurde mit polyklonalen Antikörpern gegen E-cadherin (1:500),  $\beta$ -catenin (1:500), und  $\beta$ -Aktin (1:2000) sowie dem monoklonalen Antikörper gegen Myc (1:2000) inkubiert. Der Nachweis von  $\beta$ -Aktin diente hierbei als Maß für die Qualität und die Quantität der Proteinextrakte.

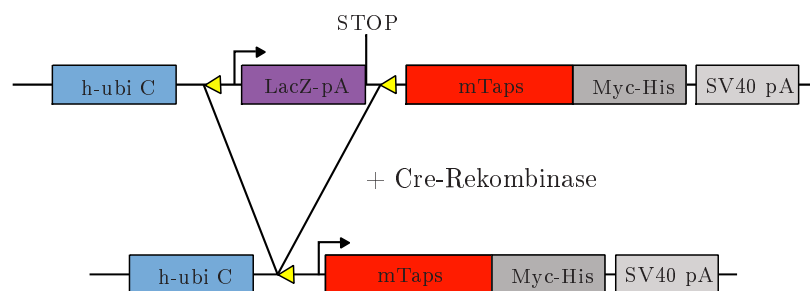
schließlich in suprabasalen Zellen nachgewiesen werden, was auf eine wichtige Funktion in der terminalen Differenzierung von Epithelzellen hindeutet. Um die Rolle von Taps bei der Differenzierung und Homöostase von Epithelien zu untersuchen, wurden Taps-überexprimierende transgene Mauslinien generiert.

#### 4.13.1 Ubiquitäre Überexpression von Taps

Zur Untersuchung der ektopischen Taps-Überexpression in der Maus, wurde zuerst der Ansatz einer induzierbaren Überexpression gewählt, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass Taps-Überexpression einen Einfluss auf die Embryonalentwicklung der Maus hat.

Für diesen Transgenansatz wurde ein Konstrukt kloniert, bei dem die Expression eines Taps-Myc/His-Fusionsproteins unter der Kontrolle des humanen Ubiquitin C-Promotors (h-ubi C) steht (von B. Hartenstein zur Verfügung gestellt). Dieser Promotor wurde bereits früher erfolgreich für die Überexpression von JunB verwendet [114]. In dem Transgen-Konstrukt (ubi-lacZ<sup>fl/fl</sup>-mTapsMyc/His) liegt darüber hinaus ein von LoxP-Stellen flankiertes  $\beta$ -Galaktosidase-Gen mit einer Translations-STOP-Sequenz zwischen Promotor und *taps*-Gen. Die Entfernung dieser Genkassette über die Cre-Rekombinase ist notwen-

dig, um die transgene Taps-Expression zu ermöglichen (Abb. 4.22).



**Abb. 4.22: Ubiquitäre Überexpression von Taps durch den hUbiquitin C-Promotor.**

In diesem induzierbaren Transgen-Konstrukt steht die Expression von Taps unter der Kontrolle des humanen Ubiquitin C-Promotors (h-ubi C). Der *taps*-cDNA-Sequenz (mTaps) voran geht das Gen für  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ), das von zwei LoxP-Stellen flankiert wird und ein Stopkodon beinhaltet. Bei der Rekombination des Locus durch eine Cre-Rekombinase wird das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen inklusive des Stopkodons entfernt. Das Taps-Protein trägt nach Translation dieses Konstrukts den Myc/His-tag, der eine Aufreinigung des Proteins über *Talonbeads* und Detektion mit Hilfe des Myc-Antikörpers ermöglicht.

Die Funktionsfähigkeit des Transgenkonstruktes wurde zunächst in Transfektionsexperimenten in Zellen überprüft. Die Expression des Taps-Transgens konnte dabei nur in Zellen nachgewiesen werden, in denen das *ubi-lacZ<sup>fl/fl</sup>-mTaps* und ein Cre-Rekombinase Expressionsplasmid ko-transfiziert wurde. In Abwesenheit der Cre-Rekombinase war keine Taps-Expression detektierbar (J. Hess, persönliche Mitteilung). Nach dem erfolgreichen Test des Transgenkonstruktes in der Zellkultur wurde das Konstrukt unter Mithilfe der Transgeneinheit des DKFZ in die Vorkerne befruchteter Oozyten injiziert und zunächst fünf *ubi-lacZ<sup>fl/fl</sup>-mTaps*-transgene C57/BL6-Mauslinien etabliert.

### Herstellung der *ubi-Taps* Mauslinie

Die *ubi-lacZ<sup>fl/fl</sup>-mTaps* transgenen Tiere wurden mit Mäusen verpaart, die ein Transgen für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors trugen. Gewebeproben von zahlreichen Organen wurden aus den daraus resultierenden Nachkommen präpariert und zur Analyse der Taps-Transgenexpression auf mRNA- und Proteinebene verwendet. Die Zucht der Mauslinien, bei deren Nachkommen keine Expression des Taps-Transgens auf mRNA- und Proteinebene nachweisbar war, wurde eingestellt. In zwei der



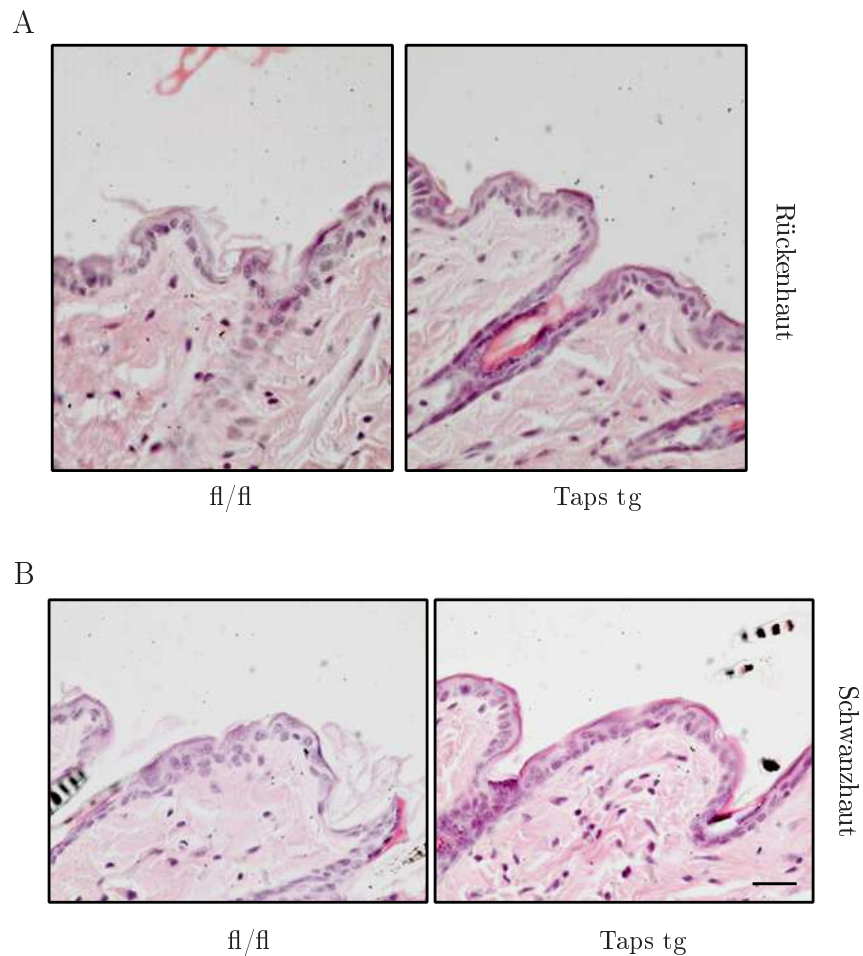
fünf Mauslinien konnte eine Expression des Transgens in mehreren Organen (v. a. Leber und Gehirn) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es wurde festgestellt, dass die Anzahl Nachkommen bei transgenen und Wildtyp-Mäuse etwa gleich war und sowohl transgene als auch Wildtyp-Tiere geboren wurden. Daher kann angenommen werden, dass die Aktivität des Ubiquitin-Promotors während der Embryonalentwicklung und die damit einhergehende ubiquitäre Expression von Taps keinen Einfluss auf die Entwicklung der transgenen Mäuse hatte (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die Nachkommen einer Linie ein zweites Mal mit Mäusen verpaart, die das Transgen für die Cre-Rekombinase besaßen, um eine Deletion der LacZ-Kassette in der Keimbahn zu erreichen. Die Nachkommen dieser Zucht begründeten die sogenannte ubi-mTaps-Linie und zeigten die Expression des Taps-Transgens selbst in der Abwesenheit der Cre-Rekombinase.

### **Mausentwicklung und Phänotyp**

Gewebeschnitte zahlreicher Organe (u.a. Rückenhaut, Schwanzhaut, Gehirn, Leber, Niere) der ubi-Taps-Linie sowie von Wildtyp- und ubi-LacZ<sup>fl/fl</sup>-mTaps-Kontrollen wurden mit Hilfe von Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbungen auf histologische Veränderungen untersucht. Hier konnte in keinem der analysierten Gewebe ein Effekt einer exogenen Taps-Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.23 und Daten nicht gezeigt).

### **Hypergranulose-Phänotyp nach chronischer TPA-Behandlung**

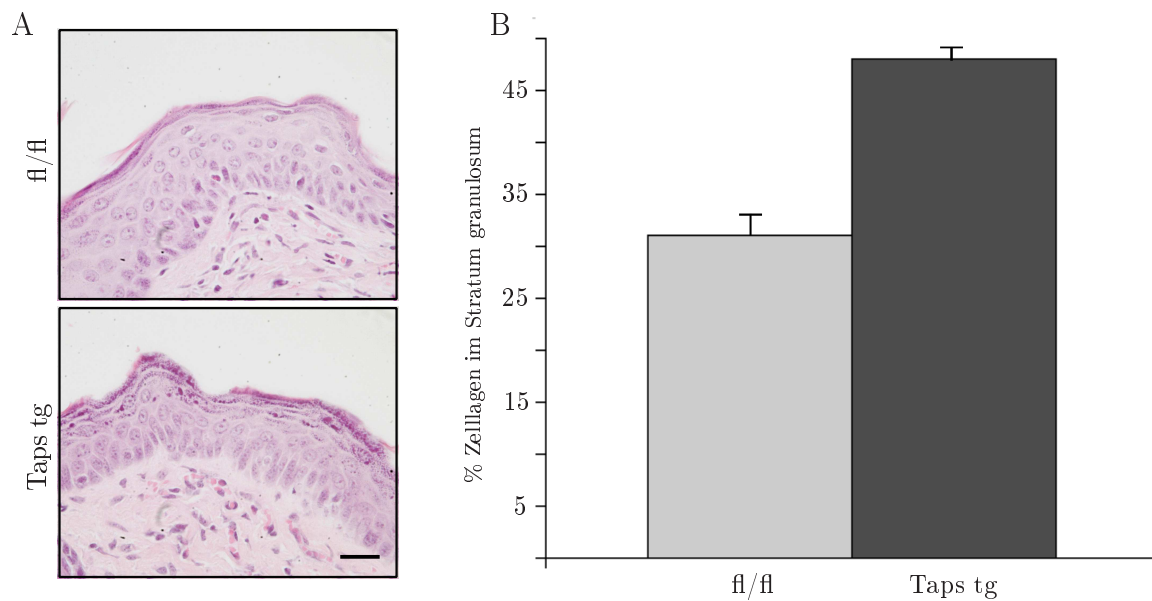
Da die Taps-transgenen Mäuse keine Veränderung in der Entwicklung der Haut zeigten, wurde durch Behandlung mit TPA der Einfluss eines Stress-Stimulus auf die Homöostase der Rückenhaut untersucht. Für diesen Versuch wurde die Rückenhaut von transgenen und Kontroll-Mäusen rasiert und anschließend dreimal im Abstand von 48 Stunden 100  $\mu$ M TPA appliziert. 48 Stunden nach der dritten TPA-Behandlung wurden die Rückenhäute präpariert, fixiert und in Paraffin eingebettet. Gewebeschnitte von 6  $\mu$ m Dicke wurden mit Hämatoxylin gefärbt und mikroskopisch analysiert. Die Epidermis war sowohl bei den Wildtyp-Mäusen als auch bei den Taps-transgenen Mäusen stark hyperplastisch. Ein wesentlicher Unterschied konnte jedoch in der Schichtung der hyperplastischen Epider-



**Abb. 4.23: Die histologische Analyse der Rücken- und Schwanzhaut von Taps-transgenen Tieren zeigt keine Unterschiede zu ubi-LacZ<sup>fl/fl</sup>-Tieren.** Für diese Analyse wurden Paraffinschnitte von Rücken- und Schwanzhaut von Taps-transgenen (Taps tg) und Kontrolltieren (fl/fl) mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und in Entellan eingebettet. (Größenmarker: 25  $\mu$ m)

mis festgestellt werden. Bei ubi-LacZ<sup>fl/fl</sup>-mTaps-Kontrollen bestanden von den Zelllagen unterhalb des *Stratum corneum* 31% aus Keratinozyten des *Stratum granulosum*. Im Vergleich dazu waren es bei den Taps-transgenen Mäusen 48% (Abb. 4.24).

Eine ubiquitäre Taps-Überexpression in der Epidermis führt nach Einwirken eines Stress-Stimulus wie TPA demnach zu einer Verdickung des *Stratum granulosum* und somit zur Ausbildung eines Hypergranulose-Phänotyps.



**Abb. 4.24: Taps-transgene Mäuse haben ein verdicktes *Stratum granulosum* nach chronischer TPA-Behandlung.** **A** Für die histologische Analyse der chronisch TPA-behandelten Rückenhaul wurden Paraffinschnitte von Taps-transgenen (Taps) und Kontrolltieren (fl/fl) mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und in Entellan eingebettet. (Größenmarker: 25  $\mu$ m) **B** Die Grafik zeigt den Prozentsatz der Zelllagen in hyperplastischer Epidermis von Wildtyp (fl/fl) und transgenen (Taps) Mäusen nach TPA-Behandlung an, der histologisch zum *Stratum granulosum* gehört. Hierfür wurden insgesamt 15 bzw. 16 Bilder der Epidermis von 4 bzw. 5 Mäusen ausgewertet. Die Fehlerbalken geben den jeweiligen Standardfehler an.

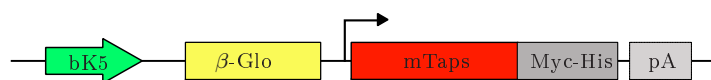
#### 4.13.2 Etablierung einer Mauslinie mit gewebespezifischer

##### Taps-Überexpression

Nachdem die ubiquitäre Überexpression von Taps zu einer veränderten Differenzierung der Maushaut führte, stellte sich nun die Frage, ob es sich dabei um einen zellautonomen Phänotyp der Keratinozyten handelt oder ob er durch eine Wechselwirkung mit anderen Taps-exprimierenden Zellen zustande kommt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine Taps-transgene Mauslinie etabliert, die Taps spezifisch in basalen Keratinozyten der Haut überexprimiert.

### Beschreibung und funktioneller Test der Transgenkonstrukte

Das Konstrukt, das zu diesem Zweck kloniert wurde, enthält die kodierende cDNA-Sequenz für murines Taps unter der Kontrolle des Rinder-Keratin 5-Promotors (Abb. 4.25). Das Konstrukt beinhaltet außerdem das  $\beta$ -Globin-Intron, was zu einer effizienteren Transgenexpression beiträgt [14, 94], sowie den Myc/His-*tag*, der eine Aufreinigung des transgenen Taps aus Proteinextrakten verschiedener epithelialer Gewebe mit Hilfe der Ionenaffinitätschromatografie ermöglicht (von B. Hartenstein zur Verfügung gestellt).



**Abb. 4.25: Transgen-Konstrukt zur gewebespezifischen Überexpression von Taps.** Für die gewebespezifische Überexpression von Taps in Epithelien wurde ein Konstrukt kloniert, in dem das offene Leseraster des murinen Taps unter der Kontrolle des Rinder-Keratin 5-Promotors (bK5) steht. Die Taps-cDNA besitzt in diesem Konstrukt ebenfalls den Myc/His-*tag*, so dass eine Aufreinigung von Taps aus Proteinextrakten mit *Talonbeads* über den 6xHistidin-Rest und ein Nachweis im *Western Blot* mit einem Anti-Myc-Antikörper weiterhin möglich ist. Das  $\beta$ -Globin-Intron ( $\beta$ -Glo) dient der Verbesserung der Proteinexpression.

Die Funktionsfähigkeit des Transgen-Konstruktes wurde in Rinderepithelzellen getestet (J. Hess, persönliche Mitteilung), bevor eine Injektion der DNA in murine Oozyten erfolgte.

### Herstellung der bK5-Taps Mauslinie

Zur Herstellung der bK5-Taps Mauslinie wurde in Zusammenarbeit mit der Transgen-einheit des DKFZ das Transgen-Konstrukt in befruchtete murine Eizellen injiziert und diese Eizellen dann in die Gebärmütter scheinschwangerer NMRI-Mäuse eingesetzt. Die daraus entstandenen Mäuse wurden in einer transgenspezifischen PCR und mit Hilfe von *Southern Blots* dahingehend untersucht, ob die DNA des Transgenkonstrukts in das Maus-Genom integriert worden war (Daten nicht gezeigt). Diejenigen Mäuse, die in beiden Analysen positiv für das Transgenkonstrukt getestet worden waren, wurden mit Wildtyp-Mäusen verpaart, um anhand der Nachkommen festzustellen, ob das Transgen auch weitervererbt wird. Nach dieser Selektion und dem Nachweis, dass die Tiere das Transgen

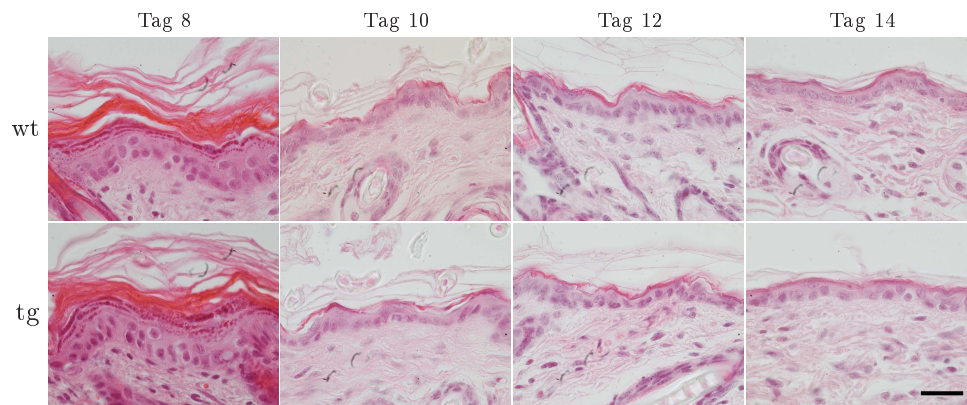
auch auf Proteinebene exprimieren (J. Hess, persönliche Mitteilung), konnte eine bK5-Taps Mauslinie weitergezüchtet werden, die Taps konstitutiv in Keratinozyten der Haut exprimiert.

### **Mausentwicklung und Einfluss exogener Taps-Expression auf die Homöostase der Haut**

Ein Vergleich der Zahlen für transgene und Wildtyp-Nachkommen dieser Linie bestätigte, dass die Überexpression von Taps, wie bereits für die ubi-mTaps-Linie beschrieben, auch in dieser Maus-Linie keinen Einfluss auf die Embryonalentwicklung hat. Um den Einfluss der exogenen Taps-Expression auf die Homöostase der Haut zu analysieren, wurde die Rückenhaut von Wildtyp (wt) und transgenen (tg) Mäusen an Tag 8, 10, 12 und 14 nach der Geburt präpariert, fixiert und in Paraffin eingebettet. Das Alter der Mäuse wurde so gewählt, da in diesem Zeitfenster aus der Epidermis der neugeborenen Maus, die ca. 4-5 Zelllagen umfasst, die typische adulte, 1- bis 3-lagige Epidermis wird. In neugeborenen Mäusen ist darüber hinaus die endogene Taps-Expression noch sehr hoch, während in der adulten Haut die endogene Taps-Expression sehr niedrig ist (Daten nicht gezeigt). Es schien daher möglich, dass am Übergang von Neugeborenen-Haut zu adulter Haut die Überexpression von Taps einen Effekt auf die Homöostase und Histologie der Epidermis zeigt. Gewebeschnitte der genannten Proben wurden anschließend mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, um etwaige Veränderungen der Histologie in Taps-transgenen Mäusen gegenüber ihren Wildtyp-Geschwistern feststellen zu können.

Die mikroskopische Analyse der HE-Färbungen ergab, dass die exogene Expression von Taps in basalen Keratinozyten während der Entwicklung der adulten Maushaut nicht zu einer Veränderung der Histologie der Epidermis führt.

Da die Ergebnisse der Analysen der humanen und murinen Hautläsionen auf eine Funktion von Taps in der Homöostase der Epidermis schließen ließen, wurde in Wildtyp und Taps-transgenen Mäusen verschiedenen Alters Histologie, Proliferation und Differenzierung der epidermalen Keratinozyten mit indirekten Immunfluoreszenz-Analysen auf entsprechende Markerproteine analysiert. Ziel war es herauszufinden, ob durch die Über-



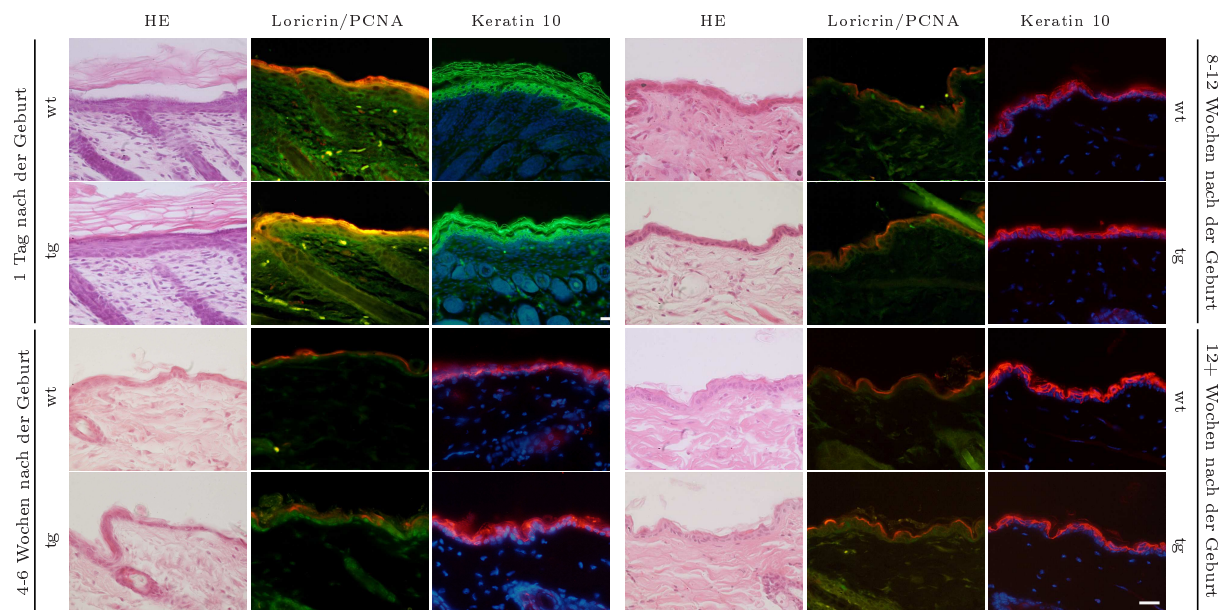
**Abb. 4.26: Die exogene Taps-Expression in basalen Keratinozyten hat keinen Einfluss auf die Entwicklung der adulten Maushaut.** Von Wildtyp (wt) und Taps-überexprimierenden (tg) Mäusen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Geburt die Rückenhaut präpariert, fixiert und in Paraffin eingebettet. Paraffinschnitte von 6  $\mu\text{m}$  Dicke wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, lichtmikroskopisch begutachtet und dokumentiert. (Größenmarker: 25  $\mu\text{m}$ .)

expression von Taps in basalen Keratinozyten Veränderungen in einem oder mehreren dieser Parameter detektiert werden können und ob diese Veränderungen abhängig vom Alter der transgenen Maus sind. Als Marker dienten PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), das nur in sich teilenden Zellen exprimiert wird, sowie Keratin 10 und Loricrin als Marker für suprabasale und terminal differenzierende Keratinozyten. Hämatoxylin-Eosin gefärbte Gewebeschnitte dienten der Beurteilung der Histologie.

Bei der Auswertung der Färbungen wurde deutlich, dass in der HE-Färbung zu keinem Zeitpunkt deutliche Unterschiede zwischen transgener und Wildtyp-Epidermis detektiert werden können. Bei den Färbungen auf PCNA, Loricrin und Keratin 10 wurden keine signifikanten Unterschiede sichtbar (Abb. 4.27). Die Homöostase der Epidermis Taps-überexprimierender Mäuse unterscheidet sich diesen Experimenten zufolge zu keinem der untersuchten Zeitpunkte von der Homöostase der Haut bei Wildtyp-Mäusen oder den transgenen Tieren der ubi-mTaps-Linie.

### Hypergranulose nach chronischer TPA-Behandlung bei Taps-Überexpression

Die bisherigen Versuche zur Charakterisierung der Taps-transgenen Mäuse zeigten keine Unterschiede in der Homöostase der Epidermis im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern.

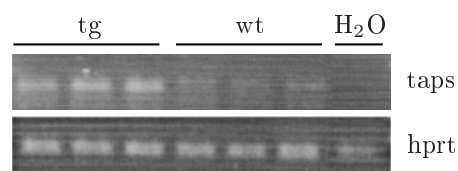


**Abb. 4.27: Taps-Expression in basalen Keratinozyten hat keinen Einfluss auf die Homöostase der Mauhaut.** Die Rückenhaut von Wildtyp (wt) und Taps-überexprimierenden (tg) Mäusen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten präpariert, in Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Gewebeschnitte ( $6\ \mu\text{m}$  dick) der einzelnen Proben wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert bzw. in indirekten Immunfluoreszenz-Analysen mit Antikörpern gegen PCNA (1:300), Loricrin (1:400) oder Keratin 10 (1:250) inkubiert. Zur Visualisierung dienten Cy3 (Loricrin und Keratin 10)- bzw. Alexa488 (PCNA)-gekoppelte Sekundärantikörper (1:500). Die Bilder dieser Färbungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. (Größenmarker:  $25\ \mu\text{m}$ )

Bei ubiquitärer Taps-Überexpression wurde nach Behandlung der Rückenhaut mit TPA eine deutliche Hypergranulose in Taps-transgener Haut im Vergleich zu Kontrolltieren sichtbar. Nun wurde auch bei transgenen Mäusen, die Taps unter der Kontrolle des Keratin 5-Promotors spezifisch in Keratinozyten überexprimieren, die Reaktion der Epidermis auf Behandlung mit TPA untersucht. Für dieses Experiment wurde die Rückenhaut von transgenen und Wildtyp-Mäusen rasiert und anschließend dreimal im Abstand von 48 Stunden mit  $100\ \mu\text{M}$  TPA behandelt. 48 Stunden nach der dritten TPA-Applikation wurden die Rückenhäute präpariert. Um herauszufinden, ob in Taps-transgenen Mäusen nach chronischer TPA-Behandlung größere Mengen von Taps nachgewiesen werden können als in Wildtyp-Tieren, wurde aus behandelter Haut RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Das Ergebnis der durchgeführten RT-PCR-Analyse mit *taps*-spezifischen Oligonukleoti-



den zeigt, dass bei gleicher Menge eingesetzter cDNA deutlich mehr Signal für *taps* in der Haut der transgenen Maus nachgewiesen werden kann als in der Haut des Kontrolltieres (Abb. 4.28).



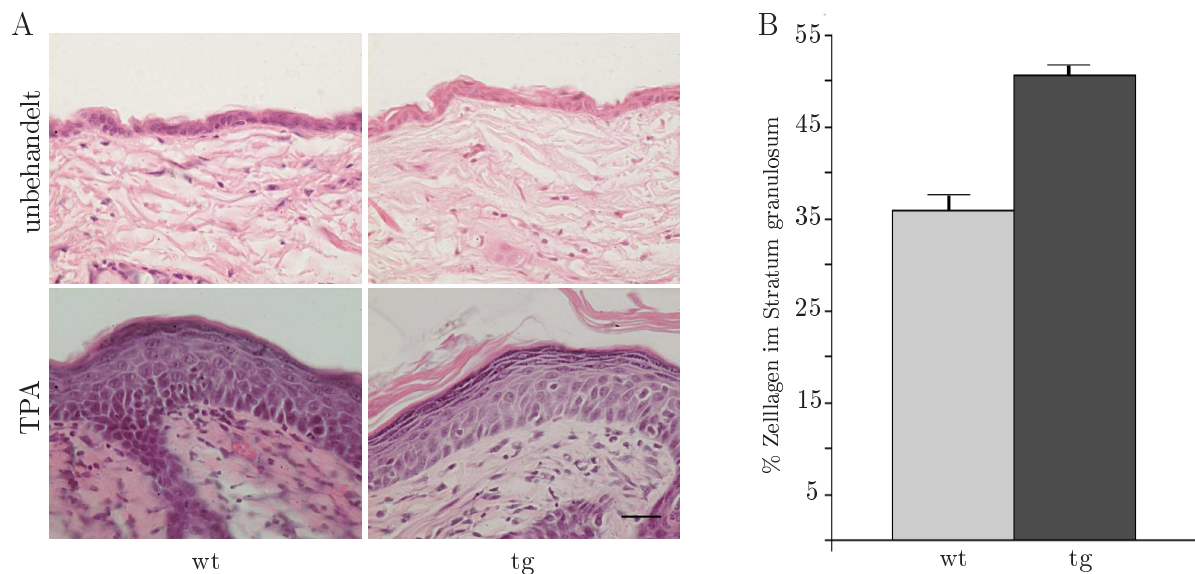
**Abb. 4.28: *Taps*-mRNA-Expression nach TPA-Behandlung.** Aus TPA-behandelter Rückenhaut einer *Taps*-transgenen und einer Wildtyp-Maus wurde RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die RT-PCR-Analyse der Gesamt-*Taps*-Expression (transgen + endogen) zeigt, dass in der transgenen Maus mehr *taps* exprimiert wird als in der Wildtyp-Kontrolle. Als Kontrolle der cDNA-Qualität und -Quantität diente eine PCR mit *hppt*-spezifischen Oligonukleotiden.

Nach TPA-Behandlung ist die Transkription von *Taps* in den transgenen Mäusen also deutlich stärker als in Wildtyp-Kontrollen, was darauf zurück geführt werden kann, dass sowohl das endogene *Taps* als auch die Expression des Transgens unter der Kontrolle des bK5-Promotors als Reaktion auf TPA induziert wird.

Chronisch TPA-behandelte Rückenhaut wurde außerdem in Paraformaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und für Gewebeschnitte verwendet. Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung dieser Gewebeschnitte zeigte, dass die Rückenhaut bei TPA-behandelten Wildtyp- und *Taps*-transgenen Mäusen im Vergleich zu unbehandelter Haut deutlich hyperplastisch war. In *Taps*-transgenen Tieren konnte außerdem eine veränderte Schichtung der hyperplastischen Haut festgestellt werden (Abb. 4.29A). Das *Stratum granulosum* nimmt in transgenen Tieren einen Anteil von ca. 51% der Zellschichten unterhalb des *Stratum corneum* ein, in Wildtyp-Mäusen hingegen nur einen Anteil von ca. 38% (Abb. 4.29 B).

Dieser Phänotyp und das Ergebnis der RT-PCR-Analyse weisen darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression von *Taps* und der Homöostase der Epidermis bestehen könnte.



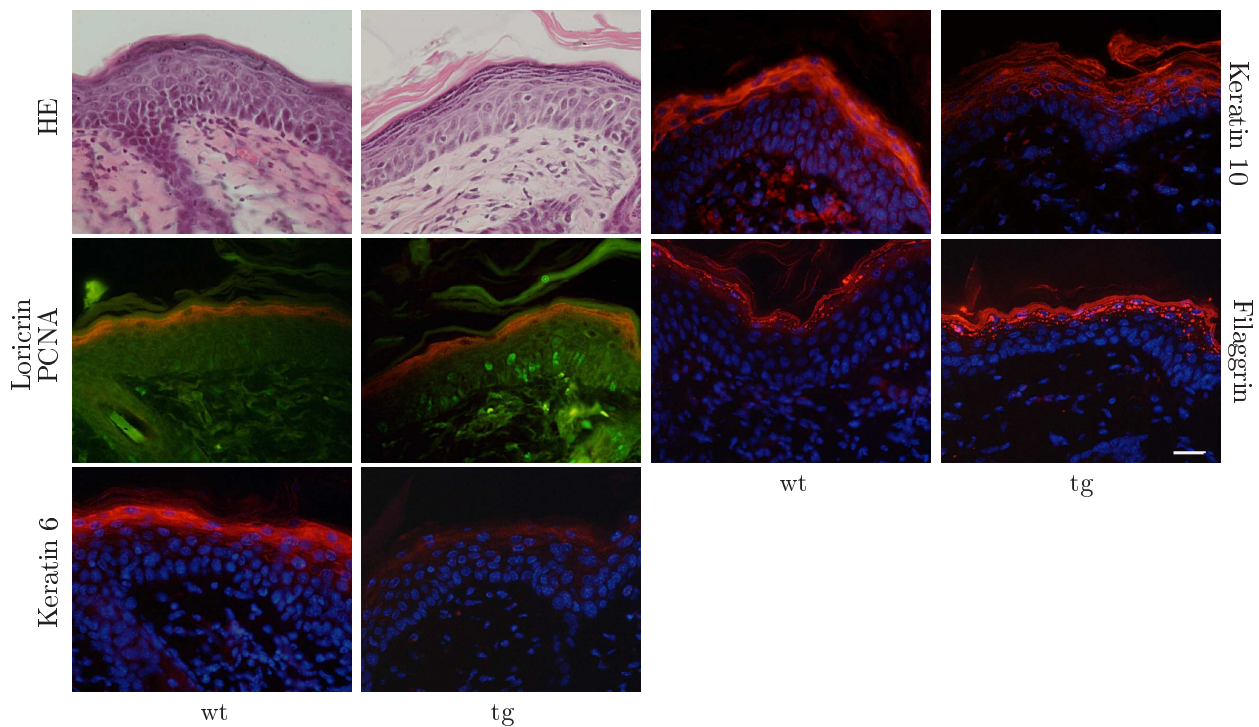


**Abb. 4.29: Exogene Taps-Expression führt zu einer veränderten Histologie nach TPA-Behandlung.** **A** Die Rückenhaut von Wildtyp und Taps-transgenen Mäusen wurde rasiert, dreimal im Abstand von 48 Stunden mit TPA behandelt und 48 Stunden nach der letzten Behandlung präpariert. Als Vergleich dient hier unbehandelte Maushaut. Die Haut wurde mit Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Gewebeschnitte ( $6\ \mu\text{m}$  dick) wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Bilder wurden mit einem Lichtmikroskop aufgenommen. (Größenmarker:  $25\ \mu\text{m}$ ) **B** Die Grafik zeigt den prozentualen Anteil, den das *Stratum granulosum* an allen Zellschichten unterhalb des *Stratum corneum* in TPA-behandelter Haut einnimmt. Ausgewertet wurden insgesamt 12 bzw. 15 Bilder (von 4 bzw. 6 Mäusen) von Wildtyp- bzw. Taps-transgener Haut nach TPA-Behandlung. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler über alle je Genotyp ausgewerteten Bilder.

### Charakterisierung durch IF-Analysen

Die beschriebene Veränderung in der Homöostase der Epidermis nach TPA-Behandlung, die in einer Verdickung des *Stratum granulosum* sichtbar wird, wurde durch Immunfluoreszenz-Färbungen mit Antikörpern gegen Proliferations- und Differenzierungsmarker wie PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), Loricrin, Keratin 6 und 10, sowie Filaggrin weiter analysiert. Bei Taps-transgenen Tieren können durch die Färbung auf PCNA nicht signifikant mehr proliferierende Zellen detektiert werden als bei Wildtyp-Tieren und die Expression von Loricrin ist nicht verändert. Unterschiede werden hingegen in den Färbungen gegen Keratin 6, Keratin 10 und Filaggrin sichtbar: Die Anzahl Zellen, die Keratin 6 als Marker für eine Aktivierung nach einem Stress-Stimulus exprimieren, ist reduziert.

Im Gegensatz dazu werden die Differenzierungsmarker Keratin 10 und Filaggrin in mehr Zellschichten bzw. verstärkt exprimiert (Abb. 4.30). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen der Taps-Expression und der Differenzierung von Keratinozyten besteht.



**Abb. 4.30: Exogene Taps-Expression in basalen Keratinozyten verändert die Differenzierung nach TPA-Behandlung.** Wildtyp (wt) und Taps-transgene (tg) Mäuse wurden rasiert und dreimal im Abstand von 48 Stunden mit TPA behandelt. 48 Stunden nach der letzten Behandlung wurde die Rückenhaut präpariert, fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Gewebeschnitte wurden entweder mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt oder einer indirekten Immunfluoreszenz-Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Loricrin (1:500), PCNA (1:300), Keratin 6 (1:500), Keratin 10 (1:250) und Filaggrin (1:500) unterzogen. Die Visualisierung der Immunfluoreszenz-Signale erfolgte mit Cy3 (Loricrin, Keratin 6, Keratin 10 und Filaggrin)- bzw. Alexa488 (PCNA)-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:500) und H33342 ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zur Färbung der Zellkerne. Die Bilder wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops (HE-Färbung) bzw. eines Fluoreszenzmikroskops aufgenommen. (Größenmarker:  $25\mu\text{m}$ .)

# Kapitel 5

## Diskussion

### 5.1 Taps - Expression in gesundem Gewebe

Taps wird auf mRNA-Ebene und Proteinebene in mehrschichtigen Epithelien exprimiert. Die Expression ist auf einzelne Keratinozyten in der Epidermis als mehrschichtigem, verhorntem Epithel und auf Zellen im Haarfollikel beschränkt. In mehrschichtigen, unverhornten Epithelien wird Taps spezifisch in Zellen des *Stratum intermedium* transkribiert. Im Thymus, einem lympho-epithelialen Gewebe, dessen Hassall-Körperchen aus Epithelzellen bestehen und verschiedene Markerproteine für Keratinozyten exprimieren, könnte Taps ebenfalls nachgewiesen werden. Einen Hinweis darauf liefern RT-PCR-Analysen auf Taps mit RNA aus dem Maus-Thymus. Diese Daten werden von den Expressionsanalysen bei Matsui et al. bestätigt [82].

Darüber hinaus konnte eine Expression von Taps in Drüsenzellen nachgewiesen werden, so dass Taps nicht nur für die Funktion von Oberflächenepithelien sondern auch von Drüsenzellen wichtig zu sein scheint. Aufgrund der fehlenden Expression von Taps in der Leber [82] ist jedoch eine Funktion in komplexen Drüsengeweben nicht zu erwarten.

Das zeitlich und lokal eng begrenzte Auftreten der Taps-Expression in der Homöostase mehrschichtiger Epithelien und nach TPA-Behandlung deutet auf eine kurze Halbwertszeit von *taps*-mRNA und Protein hin. Die Behandlung der Haut mit dem Phorbolester TPA führt rasch zu Hyperplasie und Entzündungen durch die Imitation des Signaltransdukti-

onsweges über Proteinkinase C und Diazylglyzerol [81] und induziert die Differenzierung von Keratinozyten. Hierbei übernehmen Proteine, deren Expression durch TPA reguliert wird, eine wichtige Funktion in der Zellzykluskontrolle, der Zelladhäsion und der Differenzierung von epithelialen Zellen [5]. Die Expression von Taps gleicht der Expression verschiedener anerkannter Differenzierungsmarker, die auf mRNA-Ebene alle streng auf bestimmte Zelllagen begrenzt exprimiert werden. Die mRNAs der Keratine 5 und 14 werden nur in Basalzellen, der Keratine 1 und 10 nur in Zellen des *Stratum spinosum* und die mRNAs von Loricrin und Filaggrin ausschließlich im *Stratum granulosum* exprimiert, wobei die Induktion eines Gens strikt an die Repression anderer Gene gekoppelt ist [28]. Taps kann demnach als weiterer Marker für terminal differenzierende Epithelzellen gelten, wobei die strikt begrenzte Lokalisation auf eine sehr spezifische Funktion von Taps hindeutet.

## 5.2 Transkriptionelle Regulation der Taps-Expression

Die durchgeführten Experimente weisen darauf hin, dass Taps ein AP-1 Zielgen ist. Dafür spricht, dass die TPA-induzierte Expression durch Dexamethason inhibiert werden kann, sowie das Vorhandensein eines funktionellen *TPA responsive element* (TRE). Ein TRE ist eine konservierte Sequenz, die häufig in den Promotorregionen der Gene vorhanden ist, die durch TPA induziert werden [1, 2]. Proteinbindungsexperimente sowie Immunfluoreszenzanalysen auf Gewebeschnitten identifizierten c-Fos/JunB-Heterodimere als die AP-1-Komplexe, welche die TPA-induzierte Taps-Expression regulieren. Die Regulation der *taps*-Expression ähnelt daher der basalen Expression von Loricrin, dessen Expression ebenfalls durch ein c-Fos/JunB-Heterodimer reguliert wird. Hier konnte außerdem gezeigt werden, dass im *loricrin*-Promotor ein negativ wirkendes Element lokalisiert ist, welches bewirkt, dass Loricrin, wie Taps, spezifisch nur im *Stratum granulosum* exprimiert wird [27]. Welche Basensequenz dieses negativ wirkende Element hat, ist bisher nicht bekannt, so dass kein Sequenzvergleich mit dem *taps*-Promotor durchgeführt wurde, über den ein ähnliches Motiv für die Regulation von Taps zu identifiziert werden könnte.

Im Gegensatz zur induzierten Expression von Taps in Keratinozyten der Epidermis konnte bisher nicht nachgewiesen werden, welche Transkriptionsfaktoren die basale Expression von Taps in mehrschichtigen Epithelien regulieren. Es ist jedoch bekannt, dass die korrekte lokale und zeitliche Expression von Genen durch das Zusammenspiel bestimmter Transkriptionsfaktoren, darunter Komplexen der AP-1-Familie, festgelegt wird [106]. Die basale Expression von Taps scheint unabhängig von c-Fos zu sein, da in unbehandelten c-Fos-defizienten Mäusen keine Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen in der Taps-Expression detektiert werden konnten. C-Fos wird in der Maushaut vor allem im *Stratum basale* und nur sehr schwach in suprabasalen Zellschichten exprimiert [5]. Eine Beteiligung an der basalen Expression von Taps im *Stratum granulosum* ist daher eher unwahrscheinlich. Ob JunB an der Regulation der basalen Expression von Taps beteiligt ist, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Für eine solche Regulation spricht jedoch, dass die Expression von JunB im *Stratum granulosum* bei Maus und Mensch nachgewiesen werden konnte [18, 108, 5]. Im Gegensatz zur murinen Haut wäre in der humanen Haut die basale Regulation der Taps-Expression durch c-Fos und JunB denkbar, da hier beide AP-1-Untereinheiten im *Stratum granulosum* exprimiert werden [5, 83].

## 5.3 Taps-Expression in pathologischen Veränderungen der Haut

### 5.3.1 Taps in der Karzinogenese der Maushaut

Der Phorbolester TPA ist ein in Mausmodellen der Hautkarzinogenese verwendeter Tumorpromotor. Die unter der Einwirkung von TPA entstehenden Hauttumore umfassen vor allem benigne Papillome, aber auch maligne Plattenepithelkarzinome. Von der Analyse der Gene, die in diesem mehrstufigen Prozess differentiell exprimiert werden, erhofft sich die biomedizinische Forschung Einsichten in den Ablauf der Veränderungen, die für den Weg einer normalen zu einer transformierten Zelle eines malignen Tumors charakteristisch sind [81, 138]. Gene, die in verschiedenen Stadien der Karzinogenese differentiell

exprimiert werden, sind in diesem Zusammenhang besonders interessant als mögliche Ziele diagnostischer oder therapeutischer Ansätze. Taps wird auf mRNA- und Proteinebene in Hautproben aus Experimenten zur chemisch induzierten Hautkarzinogenese, in Papillomen und malignen Plattenepithelkarzinomen ausschließlich in verhornten und damit gut differenzierten Bereichen der Karzinome exprimiert. In gering differenzierten Arealen des Karzinoms kann keine Taps-Expression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Expression von Taps mit dem Prozess der terminalen Differenzierung der Haut und nicht mit dem Prozess der Transformation der Keratinozyten assoziiert ist und als Biomarker für maligne Progression dienen könnte. Dieses Ergebnis wird weiterhin durch Experimente mit Keratinozyten-Zelllinien mit unterschiedlich tumorigenem Potential unterstützt.

### 5.3.2 Taps - ein neuer Biomarker für die maligne Progression?

Um herauszufinden, ob das Expressionsmuster für Taps, das sich aus den *in vitro*-Experimenten und Tierversuchen ergab, für humane Gewebeproben ebenfalls Gültigkeit besitzt und Taps damit als Biomarker relevant sein könnte, wurden die Analysen zur Taps-Expression in verschiedenen Stadien der Tumorigenese u.a. mit Gewebe-*Microarrays* in immunhistochemischen Experimenten wiederholt. Hierbei wurde deutlich, dass die Taps-Expression in humanen Tumormproben und Präkanzerosen exakt die gleichen Charakteristika zeigt wie in murinen Proben. Die Expression von Taps kann suprabasal in gesunder Haut im *Stratum granulosum* und in neoplastischen Läsionen ausschließlich in Keratinozyten in der unmittelbaren Umgebung verhornter Einschlüsse nachgewiesen werden. In dedifferenzierten Bereichen der Tumore wird kein Taps exprimiert. In Basaliomen, die durch die unkontrollierte Proliferation basaler Keratinozyten entstehen, denen die Fähigkeit zur terminalen Differenzierung fehlt, kann keine spezifische Taps-Expression nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen resultiert die Frage, ob der Verlust von Taps kausal für die maligne Progression eines Tumors verantwortlich sein könnte. Ein solcher kausaler Zusammenhang wäre über die Repression der Taps-Expression aufgrund epigenetischer Veränderung der DNA im *taps*-Gen oder -Promotor möglich. Epigeneti-

sche Veränderungen wie z.B. die Methylierung von Tumorsuppressorgenen wurden u.a. für die Hautkarzinogenese bereits identifiziert [40, 127]. Erste Experimente mit 5'-Aza-2'-desoxycytidin deuten darauf hin, dass die Expression von Taps durch Methylierung der DNA in späten Stadien der Hautkarzinogenese reprimiert sein könnte. Im Gegensatz dazu wäre ebenfalls denkbar, dass die Dedifferenzierung von Tumorzellen während der Progression die Konsequenz aus dem Verlust differenzierender, Taps-exprimierender Keratinozyten ist. Alle bisherigen Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die Expression von Taps für die Differenzierung von Keratinozyten und anderen Epithelzellen wichtig ist und keine Rolle für die Transformation dieser Zellen spielt.

Um dieser Vermutung weiter nachzugehen, wurden Gewebeschnitte von Patienten mit nicht-neoplastischen Hautläsionen, die durch Hyperkeratose verschiedenen Schweregrades gekennzeichnet sind, und von aktinischer Keratose als einer hyperkeratotischen Präkanzerose, die sich zu einem Plattenepithelkarzinom weiterentwickeln kann, auf die Expression von Taps-Protein untersucht. Zu den untersuchten Hautläsionen zählen Ekzeme, die durch Akanthose und Parakeratose gekennzeichnet sind und Lichen ruber, für den ein deutlich verdicktes *Stratum granulosum* (Hypergranulose) und eine Degeneration der klaren Abgrenzung von Epidermis und Dermis durch die Basalzellschicht charakteristisch ist. Taps wird in allen diesen Läsionen im *Stratum granulosum* stark exprimiert, sofern dieses noch vorhanden ist und nicht aufgrund einer beschleunigten Differenzierung unterhalb von parakeratotischen Arealen fehlt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der kürzlich erschienenen Publikation von Bernard et al., welche die Identifizierung der *Skin Aspartic Protease* (SASPase), die mit dem humanen Taps identisch ist beschreibt [10]. Bernard et al. weisen in Psoriasis ebenfalls eine SASPase(Taps)-Expression im *Stratum granulosum* sowie im *Stratum corneum* nach [10]. In ulzerierender Epidermis konnte von Bernard et al. eine Expression von SASPase ausschließlich in intakter, an den Ulcus angrenzender Epidermis nachgewiesen werden. Im Bereich des Ulcus, der einer nicht-heilenden Wunde entspricht und daher keine normale Differenzierung zeigt, konnte keine Expression detektiert werden. Auch diese Ergebnisse unterstützen die Interpretation, dass die Expression von Taps eng mit der Differenzierung der Epidermis assoziiert ist.

## 5.4 Taps-Überexpression bewirkt die Ausbildung einer Hypergranulose

Um die Funktion der Taps-Expression im Kontext eines komplexen Organismus zu untersuchen, wurden Taps-überexprimierende Mäuse generiert, deren Analyse weder nach ubiquitärer noch nach Epidermis-spezifischer Taps-Überexpression einen Phänotyp ergab. Die Überexpression von Taps hat demnach keinen Einfluss auf die normale Entwicklung oder Homöostase der Mausgewebe. Grund dafür könnte die hohe endogene Expression in der Embryonalentwicklung und in mehrschichtigen Epithelien sein, die durch die Überexpression des Transgens nicht signifikant gesteigert werden kann. Auch ein fehlender Stimulus, der die Aktivierung von Taps und damit die Bildung des funktionellen Proteins verhindert, könnte der Grund dafür sein, dass in unbehandelten Mäusen kein Phänotyp auftritt. Nach TPA-Behandlung jedoch ist die Schichtung der Epidermis dahingehend verändert, dass in der hyperplastischen Epidermis Taps-transgener Tiere im Vergleich zu Kontroll-Geschwistern eine relative Verdickung des *Stratum granulosum*, eine „Hypergranulose“, auftritt. Diese zellautonome Reaktion der Keratinozyten könnte durch das Überschreiten eines Schwellenwertes oder eine verstärkte Aktivierung von Taps aufgrund des Stress-Stimulus erklärt werden. Eine Immunfluoreszenz-Analyse der hyperplastischen Haut nach TPA-Behandlung ergab, dass in Taps-transgenen Mäusen weniger Keratin 6-exprimierende Keratinozyten vorhanden sind als in der Haut von Kontrolltieren. Im allgemeinen beinhaltet die Antwort eines Epithels auf eine physikalische oder chemische Noxe wie TPA den Schutz vor weiterer Schädigung durch verstärkte Expression u.a. von Keratin 6 [97], das ein Markerprotein für aktivierte und hyperproliferierende Keratinozyten [123] ist. Zu dieser Reaktion auf eine Noxe sind nur epidermale Stammzellen, *transient amplifying cells* und Keratinozyten in einem frühen Differenzierungsstadium in der Lage. Ein Keratinozyt, der auf aktivierende Signale nicht mehr reagieren kann, hat unwiderruflich den Weg der terminalen Differenzierung eingeschlagen [87]. Im Gegensatz dazu finden sich in der Haut der transgenen Mäuse nach TPA-Behandlung deutlich mehr Keratin 10- und Filaggrin-positive Keratinozyten. Keratinozyten, die bereits Pro-Filaggrin zu Filag-



grin prozessieren können, sind in einem späten Stadium der Differenzierung angekommen [98]. Durch die verstärkte Expression bzw. Aktivierung von Taps sind demnach mehr Keratinozyten der hyperplastischen Haut in einem späten Stadium der Differenzierung und können auf eine Noxe wie TPA nicht mehr mit der Expression von Keratin 6 reagieren.

Der Hypergranulose-Phänotyp der Taps-überexprimierenden Mäuse nach TPA-Behandlung ist das genaue Gegenteil zum Phänotyp JunB-defizienter Mäuse nach TPA-Applikation [38]. Darüber hinaus ist bekannt, dass eine verminderte bzw. fehlende Expression von JunB bei Maus und Mensch mit der Entwicklung einer Psoriasis in Zusammenhang steht [140]. Es wäre daher denkbar, dass die fehlende oder reduzierte JunB-Expression bewirkt, dass kein Taps exprimiert wird und anschließend aufgrund der gestörten Differenzierung die typischen psoriatischen Papeln entstehen.

Durch Generierung einer Maus, die in der Epidermis defizient für JunB ist und Taps überexprimiert, könnte untersucht werden, ob diese Annahme richtig ist. Durch die Überexpression von Taps könnte die gestörte Differenzierung eventuell wieder normalisiert werden und nach TPA-Behandlung könnte die verstärkte Differenzierung durch die Überexpression von Taps der typischen Hyperproliferation der JunB-defizienten Epidermis entgegenwirken.

## 5.5 Taps - eine neue Aspartylprotease in der Differenzierung mehrschichtiger Epithelien

Nach der Identifizierung des Expressionsprofils und der transkriptionellen Regulation von Taps nach TPA-Behandlung stellte sich die Frage, wie die proteolytische Aktivität von Taps reguliert ist und welche Substrate von Taps prozessiert werden.

### 5.5.1 Autoproteolyse und Lokalisation von Taps

Lange Zeit wurde angenommen, dass Proteasen ausschließlich für die intralysosomale Degradation verantwortlich sind. Heute ist bekannt, dass die Regulation der Aktivität proteo-

lytisch aktiver Enzyme essentiell für die Homöostase von Zellen und Geweben ist [139, 25].

Typisch für alle zellulären, bakteriellen und viralen proteolytischen Enzyme ist ihre Synthese als inaktive Vorstufen (Zymogene), um ungewollten Proteinabbau zu verhindern [65]. Die Aktivierung der Zymogene erfolgt durch limitierte Proteolyse eines „Aktivierungs-segments“ innerhalb eines bestimmten zellulären Kompartiments oder in einem speziellen extrazellulären Milieu. Die Aktivierung erfolgt entweder autoproteolytisch, z.B. nach einer Veränderung des pH-Wertes, oder durch andere Proteasen bzw. akzessorische Moleküle. Viele Zymogene verfügen über einen N-terminalen Abschnitt, der die Bindung eines Substrates verhindert und entfernt werden muss, um die Prozessierung des Substrates zu ermöglichen [65].

Taps ähnelt aufgrund seiner Aminosäuresequenz retroviralen Aspartylproteasen und wird als Vorstufe synthetisiert, wie durch die Arbeiten von Bernard et al. und Matsui et al. bestätigt wird [10, 82]. Die bisher durchgeführten Experimente weisen darauf hin, dass Taps in mehreren intrazellulären Varianten exprimiert wird, die durch posttranslationale Modifikationen, ein alternatives Startkodon bzw. durch autoproteolytische Prozessierung gebildet werden. Alle diese Taps-Varianten enthalten die Aspartylprotease-Domäne. Bernard et al. beschreiben ausschließlich die Varianten, die durch Autoproteolyse entstehen und geben an, keine anderen Varianten detektiert zu haben [10].

Durch die Klonierung einer Taps-Mutante, bei der das Aspartat in der proteolytischen Domäne gegen Asparagin (D212N) ausgetauscht wurde, wurde nachgewiesen, dass Taps tatsächlich eine funktionelle Aspartylprotease ist und die Mutante bei Überexpression in Zellen eine dominant-negative Wirkung hat. Eine erfolgreiche Inaktivierung der Aspartylprotease-Domäne durch Austausch des Aspartats gegen eine andere Aminosäure wurde zuvor bereits für Pepsinogen, die HIV-Protease und Cathepsin D beschrieben [76, 68, 116, 133, 46]. Eine Autoproteolyse von SASPase (Taps) konnte von Bernard et al. und Matsui et al. ebenfalls festgestellt und durch Mutation des Aspartats in der proteolytischen Domäne zu Alanin (D212A/D212A) oder Glutamat (D212E) bzw. durch Zugabe des HIV-Protease-Inhibitors Indinavir inhibiert werden [10, 82].

Kenntnisse aus Zellkulturexperimenten mit transfizierten Zellen belegen, dass es nicht

nur intrazelluläre Varianten sondern auch sezernierte Varianten von Taps gibt. In Studien der intrazellulären Lokalisation mit Hilfe von Taps-EGFP-Fusionsproteinen und Immunfluoreszenzen gegen Markerproteine für bestimmte zelluläre Kompartimente wird die Lokalisation von Taps in der Zellmembran und im Endoplasmatischen Retikulum deutlich, die durch eine potentielle Transmembrandomäne im N-Terminus des Taps-Zymogens hervorgerufen werden könnte. Diese Lokalisation von Taps deutet darauf hin, dass einige Taps-Varianten über den sekretorischen Pfad vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat in die Außenmembran der Zelle transportiert werden. Da Taps nicht über ein typisches Sequenzmotiv für den sekretorischen *Pathway* verfügt und es in der Epidermis hauptsächlich im *Stratum granulosum* lokalisiert ist, wäre auch eine Sezernierung über Granula (*lamellar granules*) möglich, für die eine besondere Regulation der Beladung und Sezernierung diskutiert wird [92, 93, 59].

### 5.5.2 Welche Substrate vermitteln die Funktion von Taps in vivo?

Bisher wurden nur Casein und Insulin als *in vitro*-Substrate von Taps beschrieben. Mit Hilfe dieser Proteine wurde von Bernard et al. der Nachweis geführt, dass rekombinante SASPase (Taps) aus Bakterien eine funktionelle Aspartylprotease ist [10]. Es ist jedoch aufgrund des Expressionsmusters *in vivo* anzunehmen, dass diese beiden Proteine *in vivo* keine Substrate für Taps darstellen. Daher stellt sich die Frage, welche Substrate durch Taps bei der Differenzierung von Epithelien prozessiert werden.

#### Taps beeinflusst die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten

Zell-Zell-Kontakte übernehmen in der Epidermis wichtige Funktionen: Sie verbinden epitheliale Zellen miteinander und die Keratinfilamente mit der Zelloberfläche. Zell-Zell-Kontakte werden durch desmosomale Cadherine wie Desmoglein und Desmocollin, aber auch durch E- und P-cadherin ausgebildet. Fehlt in epithelialen Zellen das E-cadherin, so bilden sich keine *adherens junctions* und die Zellen zeigen eine mesenchymale Morphologie ([23] und darin genannte Referenzen). Dieser Effekt wird auch bei Taps-transfizierten Keratinozyten beobachtet. Hier ist zwar die Menge an E-cadherin in der Zelle im Ver-

gleich zu Kontrollzellen nicht reduziert, es ist jedoch nicht in der Zellmembran lokalisiert und kann daher nicht zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten dienen. Die fehlenden Zellkontakte führen zu der beobachteten Fibroblasten-ähnlichen Morphologie. Taps könnte demnach in differenzierenden Keratinozyten der Epithelien und der Epidermis bewirken, dass nach dem Abbau der Corneodesmosomen kein neues E-cadherin in die Membran eingebaut wird und die Hornschuppen einzeln abgeschilfert werden können.

### Proteasen und epidermale Differenzierung

Die Verhornung der Epidermis benötigt die massive Aktivierung epidermaler Proteasen. Diese Proteasen bewirken mindestens drei Prozesse der Hautdifferenzierung [17]:

1. Prozessierung der Pro-Formen verschiedener Proteine des *cornified envelope*.
2. Proteolytischer Abbau von Nuklei und Mitochondrien der Keratinozyten.
3. Abbau der Corneodesmosomen für die Abschlüpfung der Hornschuppen (Desquamierung).

Zu den Proteasen, die bekanntermaßen an der Differenzierung der Epidermis beteiligt sind, gehören Calpain, das Transglutaminase 1 aktiviert [66] und Pro-Filaggrin zu Filaggrin prozessiert [104], die Cathepsine C [124], L [122] und D [52] sowie Caspase-14 [126]. Dies sind Beispiele für Proteasen, die am Übergang vom *Stratum granulosum* zum *Stratum corneum* aktiv sind.

Cathepsin D ist hierbei ein Beispiel für eine Aspartylprotease, die eine Rolle in der Differenzierung der Epidermis spielt. Cathepsin D wird im *Stratum granulosum* proteolytisch prozessiert, aktiviert dadurch Transglutaminase 1 und trägt so zur Bildung des *cornified envelope* bei [89, 53]. Zahlreiche weitere Proteasen und Nukleasen sind in der Übergangszone vom *Stratum granulosum* zum *Stratum corneum* aktiv [52, 61].

In diesem Zusammenhang spielt vermutlich auch Taps eine Rolle. Bisher konnte jedoch weder ein Protein, das die Aktivität von Taps steuert, noch Substrate, die von Taps prozessiert werden, identifiziert werden.

### Potentielle Substrate von Taps

Ein mögliches Substrat von Taps *in vivo* könnte Transglutaminase 3 (TG3) sein, die in Haarfollikeln und terminal differenzierenden Keratinozyten exprimiert wird. Die Protease, die TG3 prozessiert und damit aktiviert, ist bisher nicht bekannt. Hinweise darauf, dass Taps an der Bildung des *cornified envelope* durch die Aktivierung von Transglutaminase 3 beteiligt sein könnte, finden sich in einer kürzlich erschienenen Publikation von Matsui et al. [82]. Die darin beschriebenen mSASPase (= Taps)-defizienten Mäuse zeigen als einzigen Phänotyp eine verstärkte epidermale Faltenbildung, die durch Wassermangel der Epidermis hervorgerufen werden könnte. Dieser Wassermangel könnte eventuell durch eine fehlende Aktivierung der Transglutaminase in Taps-defizienten Mäusen bedingt sein. Die Generierung von Mäusen, die induzierbar die dominant-negative Taps(D212N)-Mutante überexprimieren, könnte Aufschluss darüber geben, ob die proteolytische Aktivität von Taps für den von Matsui et al. beobachteten Phänotyp verantwortlich ist. Darüber hinaus könnte *in vitro* die Prozessierung von TG3 in An- bzw. Abwesenheit einer Taps-Expression analysiert werden.

Ein weiteres mögliches Substrat ist Caspase-14. Diese Caspase wurde 1998 entdeckt [126, 55]. Caspasen werden als Teile der proteolytischen Kaskade, die zur Apoptose einer Zelle führt, proteolytisch aktiviert [24]. Caspase-14 wird jedoch nach Einwirken eines apoptotischen Stimulus wie TNF oder Zykloheximid nicht prozessiert, so dass sie offenbar nicht Teil der klassischen apoptotischen Signalkaskade ist [77, 78]. Die Expression von Caspase-14 konnte bisher vor allem suprabasal in differenzierten Keratinozyten des *Stratum granulosum* [32, 31], in der inneren und äußeren Haarwurzelscheide, in Talgdrüsen und in Hassall-Körperchen des Thymus nachgewiesen werden [78] und stimmt daher im Expressionsmuster mit Taps überein. In epithelialen Tumoren, wie z.B. Lungenepithelkarzinomen und im Zervixkarzinom, wird Caspase-14 wie Taps ausschließlich in differenzierten Zellen exprimiert [67]. Fischer et al. postulieren Caspase-14 als Marker für eine normale Ausbildung der Epidermis, da ihre Expression und Prozessierung in Haut mit gestörter Differenzierung, wie z.B. in Psoriasis, vermindert ist [36]. In der Embryonalentwicklung wird sie ab Tag E14,5 suprabasal in der Epidermis exprimiert, allerdings

erst an Tag 17,5 in die katalytisch aktiven Untereinheiten prozessiert [35]. Die Tatsache, dass die Protease, durch die Caspase-14 prozessiert wird, nicht bekannt ist [19, 85] sowie die Übereinstimmung im Expressionsmuster von Caspase-14 und Taps geben Anlass zu Überlegungen, ob Taps in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnte. Für erste Experimente zur Beantwortung dieser Frage wurden Expressionsplasmide kloniert, die das offene Leseraster von muriner Caspase-14 beinhalten. Erste Transfektionsexperimente in HEK293-Zellen mit diesem Plasmid und in Kombination mit Taps-Expressionsvektoren zeigen, dass Caspase-14 offenbar nicht von Taps prozessiert wird, jedoch die Effizienz der Autoproteolyse von Taps positiv beeinflusst. Dies weist darauf hin, dass Taps sich möglicherweise innerhalb einer Signaltransduktionskaskade unterhalb von Caspase-14 befindet.

## 5.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit postulieren, dass Taps eine wichtige Rolle in der Differenzierung und Homöostase mehrschichtiger Epithelien spielt. In weiteren Experimenten soll nun geklärt werden, welche endogenen Substrate Taps hat. Darüber hinaus wird der Zusammenhang zwischen der Aktivität von Caspase-14 bzw. Transglutaminase 3 und Taps untersucht, der durch das praktisch identische Expressionsprofil bzw. die Ergebnisse von Matsui et al. [82] naheliegt. Darüber hinaus werden Experimente durchgeführt, um die Regulation der spezifischen Taps-Expression in differenzierten Zellen, z.B. über DNA-Methylierung zu analysieren.

Die Experimente mit den transgenen Mäusen werden in Wundheilungsstudien weitergeführt, die zeigen sollen, ob in Taps-überexprimierenden Mäusen die Wundheilung durch die veränderte Differenzierung der Keratinozyten gestört ist. Die bereits begonnene Generierung von Mäusen, die in der Epidermis JunB-defizient sind und Taps überexprimieren, wird zeigen, ob durch die Überexpression von Taps die gestörte Differenzierung in der Epidermis JunB-defizienter Mäuse nach TPA-Behandlung normalisiert werden kann. Eine TPA-Behandlung der Taps-defizienten Mäuse von Matsui et al. [82] könnte zeigen, welche Auswirkungen ein Fehlen von Taps auf die Stress-Antwort der Epidermis hat bzw.

ob der gleiche Phänotyp wie bei JunB-defizienten Mäusen beobachtet werden kann.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Taps ausschließlich in differenzierten Tumorzellen exprimiert wird und als Biomarker für die Unterscheidung verschiedener Stadien der Hautkarzinogenese geeignet sein könnte. Darauf könnten Experimente zur Evaluierung von Taps als Marker für die Differentialdiagnose von malignen und metastasierenden Tumoren verschiedener mehrschichtiger Epithelien aufbauen.

# Literaturverzeichnis

- [1] P. Angel, I. Baumann, B. Stein, H. Delius, H. J. Rahmsdorf, and P. Herrlich. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256–2266, 1987.
- [2] P. Angel, M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, and M. Karin. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, 49:729–739, 1987.
- [3] P. Angel and M. Karin. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1072:129–157, 1991.
- [4] P. Angel and A. Szabowski. Function of AP-1 target genes in mesenchymal-epithelial cross-talk in skin. *Biochem. Pharmacol.*, 64:949–956, 2002.
- [5] P. Angel, A. Szabowski, and M. Schorpp-Kistner. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*, 20:2413–2423, 2001.
- [6] Y. Barrandon and H. Green. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles for transforming growth factor alpha and epidermal growth factor. *Cell*, 50:1131–1137, 1987.
- [7] A. J. Barrett, J. F. Woessner Jr., and N. D. Rawlings, editors. *Handbook of proteolytic enzymes*, volume 1+2. Academic Press, 2nd edition, 2004.



- [8] A. Behrens, W. Jochum, M. Sibilis, and E.F. Wagner. Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. *Oncogene*, 19:2657–2663, 2000.
- [9] G. Berchem et al. Cathepsin-d affects multiple tumor progression steps *in vivo*: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene*, 21:5951–5955, 2002.
- [10] D. Bernard, B. Mehul, A. Thomas-Collignon, C. Delattre, M. Donovan, and R. Schmidt. Identification and characterization of a novel retroviral-like aspartic protease specifically expressed in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 125(2):278–287, 2005.
- [11] J. R. Bickenbach, J. M. Greer, D. S. Bundman, J. A. Rothnagel, and D. R. Roop. Loricrin expression is coordinated with other epidermal proteins and the appearance of lipid lamellar granules in development. *J. Invest. Dermatol.*, 104:405–410, 1995.
- [12] P.E. Bowden, D. Breitkreutz, H.J. Stark, and N.E. Fusenig. Expression and modification of keratins during terminal differentiation of mammalian epidermis. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 22:35–68, 1987.
- [13] U. Breitenbach, J. P. Tuckermann, C. Gebhardt, K. H. Richter, G. Fürstenberger, G. Christofori, and P. Angel. Keratinocyte-specific onset of serine protease BSSP expression in experimental carcinogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, 117(3):634–640, 2001.
- [14] R. L. Brinster, J. M. Allan, R. R. Behringer, G. E. Gelinas, and R. D. Palmiter. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85(3):836–840, 1988.
- [15] J. T. Bruder, G. Heidecker, and U. R. Rapp. Serum-, TPA- and Ras-induced expression from AP-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. *Genes Dev.*, 6(4):545–556, 1992.

- [16] C. Byrne. Regulation of gene expression in developing epidermal epithelia. *Bioessays*, 19(8):691–698, 1997.
- [17] E. Candi, R. Schmidt, and G. Melino. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6:328–340, 2005.
- [18] D. Carrasco and R. Bravo. Tissue-specific expression of the fos-related transcription factor fra-2 during mouse development. *Oncogene*, 10:1069–1079, 1995.
- [19] A. J. Chien, Presland R. B., and M. K. Kuechle. Processing of native caspase-14 occurs at an atypical cleavage site in normal epidermal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296:911–917, 2002.
- [20] J. B. Cooper. Aspartic proteinases in disease: a structural perspective. *Curr. Drug Targets*, 3:155–173, 2002.
- [21] G. Cotsarelis et al. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*, 57:201–209, 1989.
- [22] D. R. Davies. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 19:189–215, 1990.
- [23] J. A. Davies and D. R. Garrod. Molecular aspects of the epithelial phenotype. *Bioessays*, 19(8):699–704, 1997.
- [24] J.-B. Denault and G. S. Salvesen. Caspases: Keys in the Ignition of Cell Death. *Chem. Rev.*, 102:4489–4499, 2002.
- [25] D. P. Dickinson. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 13:238–275, 2002.
- [26] J. DiGiovanni. Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol. Ther.*, 54(1):63–128, 1992.

- [27] D. DiSepio, J. R. Bickenbach, M. A. Longley, D. S. Bundman, J. A. Rothnagel, and D. R. Roop. Characterization of loricrin regulation in vitro and in transgenic mice. *Differentiation*, 64:225–235, 1999.
- [28] A. Dlugosz and S. Yuspa. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J. Cell Biol.*, 120(1):217–225, 1993.
- [29] M. Dunnwald, S. Chinnathambi, D. Alexandrunas, and J. R. Bickenbach. Mouse epidermal stem cells proceed through the cell cycle. *J. Cell. Physiol.*, 195:194–201, 2003.
- [30] B. L. van Duuren and L. Orris. The tumor-enhancing principles of *Croton tiglium* L. *Cancer Res.*, 25:1871–1875, 1965.
- [31] L. Eckhart, J. Ban, H. Fischer, and E. Tschachler. Caspase-14: analysis of gene structure and mRNA expression during keratinocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 277:655–659, 2000.
- [32] L. Eckhart, W. Declercq, J. Ban, M. Rendl, B. Lengauer, C. Mayer, S. Lippens, P. Vandenabeele, and E. Tschachler. Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J. Invest. Dermatol.*, 115:1148–1151, 2000.
- [33] F. Egberts et al. Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J. Cell Sci.*, 117(11):2295–2307, 2004.
- [34] E.R. Fearon and B. Vogelstein. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61:759–767, 1990.
- [35] H. Fischer, H. Rossiter, M. Ghannadan, K. Jaeger, C. Barresi, W. Declercq, E. Tschachler, and L. Eckhart. Caspase-14 but not caspase-3 is processed during the development of fetal mouse epidermis. *Differentiation*, 73:406–413, 2005.

- [36] H. Fischer, M. Stichenwirth, M. Dockal, M. Ghannadan, M. Buchberger, J. Bach, A. Kapetanopoulos, W. Declercq, E. Tschachler, and L. Eckhart. Stratum-corneum derived caspase-14 is catalytically active. *FEBS Lett.*, 577:446–450, 2004.
- [37] L. Florin, L. Hummerich, B. T. Dittrich, F. Kokocinski, G. Wrobel, S. Gack, M. Schorpp-Kistner, S. Werner, M. Hahn, P. Lichter, A. Szabowski, and P. Angel. Identification of novel ap-1 target genes in fibroblasts regulated during cutaneous wound healing. *Oncogene*, 23:7005–7017, 2004.
- [38] L. Florin, J. Knebel, P. Zigrino, C. Vonderstrass, B. amd Mauch, M. Schorpp-Kistner, A. Szabowski, and P. Angel. Delayed wound healing and epidermal hyperproliferation in mice lacking JunB in the skin. *J. Invest. Dermatol.*, 126(4):902–911, 2006.
- [39] L. Florin, N. Maas-Szabowski, S. Werner, A. Szabowski, and P. Angel. Increased keratinocyte proliferation by JUN dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts. *J. Cell Sci.*, 118(9):1981–1989, 2005.
- [40] M. F. Fraga, M. Herranz, J. Espada, E. Ballestar, M. F. Paz, S. Roperio, E. Erkek, O. Bozdogan, H. Peinado, A. Niveleau, J. H. Mao, A. Balmain, A. Cano, and M. Esteller. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res.*, 64(16):5527–5534, 2004.
- [41] E. Fuchs. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell Biol.*, 111(6):2807–2814, 1990.
- [42] E. Fuchs and H. Green. Changes in keratin expression during terminal differentiation. *Cell*, 19:1033–1042, 1980.
- [43] G. Fürstenberger and A. Kopp-Schneider. Malignant progression of papillomas induced by the initiation-promotion protocol in NMRI mouse skin. *Carcinogenesis*, 16(1):61–69, 1995.

- [44] N. E. Fusenig, S. M. Amer, P. Boukamp, and P. K. Worst. Characteristics of chemically transformed mouse epidermal cells in vitro and in vivo. *Bull. Cancer*, 65:271–279, 1978.
- [45] N. E. Fusenig, R. T. Dzarlieva-Petrusevska, and D. Breitkreutz. Phenotypic and cytogenetic characteristics of different stages during spontaneous transformation of mouse keratinocytes in vitro. *Carcinog. Compr. Surv.*, 9:293–326, 1985.
- [46] M. Glondou, P. Coopman, V. Laurent-Matha, M. Garcia, H. Rochefort, and E. Liaudet-Coopman. A mutated cathepsin-d devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells. *Oncogene*, 20:6920–6929, 2001.
- [47] F.L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, 36(1):59–74, 1977.
- [48] D. Hanahan and R.A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57–70, 2000.
- [49] E. Hecker. Phorbol esters from croton oil: Chemical nature and biological activities. *Naturwissenschaften*, 54:282–284, 1967.
- [50] P. Herrlich. Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene*, 20:2465–2475, 2001.
- [51] R. Holliday. DNA methylation and epigenetic defects in carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 181(2):215–217, 1987.
- [52] T. Horikoshi, I. Arany, S. Rajaraman, S.-H. Chen, H. Brysk, G. Lei, S. K. Tying, and M. M. Brysk. Isoforms of cathepsin D and human epidermal differentiation. *Biochimie*, 80(7):605–612, 1998.
- [53] T. Horikoshi, S. Igarashi, H. Uchiwa, H. Brysk, and M. M. Brysk. Role of endogenous cathepsin D-like and chymotrypsin-like proteolysis in human epidermal desquamation. *Br. J. Dermatol.*, 141:453–459, 1999.

- [54] L. Hu and L.J. Gudas. Activation of Keratin 19 gene expression by a 3' enhancer containing an AP1 site. *J. Biol. Chem.*, 269(1):183–191, 1994.
- [55] S. Hu, S. J. Snipas, C. Vincenz, G. Salvesen, and V. M. Dixit. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J. Biol. Chem.*, 273:29648–29653, 1998.
- [56] L. Hummerich, R. Müller, J. Hess, F. Kokocinski, M. Hahn, G. Fürstenberger, C. Mauch, P. Lichter, and P. Angel. Identification of novel tumour-associated genes differentially expressed in the process of squamous cell cancer development. *Oncogene*, pages 1–11, 2005.
- [57] S. Igarashi et al. Cathepsin D, but not cathepsin E, degrades desmosomes during epidermal desquamation. *Br. J. Dermatol.*, 151(2):355–361, 2004.
- [58] M. Ikeguchi et al. Correlation between cathepsin D expression and p53 protein nuclear accumulation in oesophageal squamous cell carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, 55(2):121–126, 2002.
- [59] A. Ishida-Yamamoto, M. Simon, M. Kishibe, Y. Miyauchi, H. Takahashi, S. Yoshida, T. J. O'Brien, G. Serre, and H. Iizuka. Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. *J. Invest. Dermatol.*, 122:1137–1144, 2004.
- [60] E. G. Jung and I. Moll. *Dermatologie*. Georg Thieme Verlag, 2002.
- [61] J. Karásek. Nuclear morphology of transitional keratinocytes in normal human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 91:243–246, 1988.
- [62] M. Karin. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: Is DNA binding dispensable? *Cell*, 93(4):487–490, 1998.
- [63] A. Kawada, K. Hara, E. Kominami, et al. Cathepsin B and D expression in squamous cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.*, 135:905–910, 1996.
- [64] A. Kawada, K. Hara, E. Kominami, M. Hiruma, A. Ishibashi, H. Abe, E. Ichikawa, Y. Nakamura, S. Watanabe, T. Yamamoto, T. Umeda, and K. Nishioka. Expression

- of cathepsin D and B in invasion and metastasis of squamous cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.*, 137:361–366, 1997.
- [65] A. Khan and M. James. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.*, 7(4):815–836, 1998.
- [66] S. Y Kim and C. D. Bae. Calpain inhibitors reduce the cornified cell envelope formation by inhibiting proteolytic processing of transglutaminase 1. *Exp. Mol. Med.*, 30:257–262, 1998.
- [67] U. Koenig, W. Sommergruber, and S. Lippens. Aberrant expression of caspase-14 in epithelial tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 335:309–313, 2005.
- [68] N. E. Kohl, E. A. Emini, W. A. Schleif, L. J. Davis, J. C. Heimbach, R.A. Dixon, E. M. Scolnick, and I. S. Sigal. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:4686–4690, 1988.
- [69] M. Koster et al. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.*, 18(2):126–131, 2004.
- [70] M.I. Koster and D.R. Roop. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. *Eur. J. Cell Biol.*, 83:625–629, 2004.
- [71] P. Krieg, J. Finch, G. Fürstenberger, K. Melber, L. M. Matrisian, and G. T. Bowden. Tumor promoters induce a transient expression of tumor-associated genes in both basal and differentiated cells of the mouse epidermis. *Carcinogenesis*, 9:95–100, 1988.
- [72] M. Kulesz-Martin, A. E. Kilkenney, K.A. Holbrook, V. Digernes, and S. H. Yuspa. Properties of carcinogen altered mouse epidermal cells resistant to calcium-induced terminal differentiation. *Carcinogenesis*, 4:1367–1377, 1983.
- [73] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.

- [74] B. Lewin. *Genes IV*. Oxford University Press, 1997.
- [75] J. J. Li, C. Westergaard, P. Gosh, and N. H. Colburn. Inhibitors of both nuclear factor-kappaB and activator protein-1 activation block the neoplastic transformation response. *Cancer Res.*, 57:3569–3576, 1997.
- [76] X. L. Lin, R. N. Wong, and J. Tang. Synthesis, purification, and active site mutagenesis of recombinant porcine pepsinogen. *J. Biol. Chem.*, 264:4482–4489, 1989.
- [77] S. Lippens, M. Kockx, M. Knaapen, L. Mortier, R. Polakowska, A. Verheyen, M. Garmyn, A. Zwijsen, P. Formstecher, D. Huylebroeck, P. Vandenabeele, and W. Declercq. Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ.*, 7:1218–1224, 2000.
- [78] S. Lippens, C. VandenBroecke, E. Van Damme, E. Tschachler, P. Vandenabeele, and W. Declercq. Caspase-14 is expressed in the epidermis, the choroid plexus, the retinal pigment epithelium and thymic Hassall’s bodies. *Cell Death Differ.*, 10:257–259, 2003.
- [79] C. A. Loomis. *Advances in Dermatology*, volume 17, chapter 7, pages 183–210. Year Book Medical Publishers, 2001.
- [80] O.H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. A. A. L. Farr, and R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265–275, 1951.
- [81] F. Marks and G. Fürstenberger. The conversion stage of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11(12):2085–2092, 1990.
- [82] T. Matsui, Y. Kinoshita-Ida, F. Hayashi-Kisumi, M. hata, K. Matsubara, M. Chiba, S. Katahira-Tayama, Y. Morita, and S. Tsukita. Mouse homologue of skin-specific retroviral-like aspartic protease (SASPase) involved in wrinkle formation. *J. Biol. Chem.*, Epub ahead of print, 2006.



- [83] D. Mehic, L. Bakiri, M. Ghannadan, E.F. Wagner, and E. Tschachler. Fos and jun proteins are specifically expressed during differentiation of epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 124:212–220, 2005.
- [84] T. Mehrel, D. Hohl, J.A. Rothnagel, M.A. Longley, D. Bundman, C. Cheng, U. Lichti, M.E. Bisher, Steven A.C., and P.M. Steinert. Identification of a major keratinocyte envelope protein, loricrin. *Cell*, 61:1103–1112, 1990.
- [85] J. Mikolajczyk, F. L. Scott, S. Krajewski, D. P. Sutherlin, and G. S. Salvesen. Activation and substrate specificity of caspase-14. *Biochemistry*, 43:10560–10569, 2004.
- [86] L. Milstone. Epidermal desquamation. *J. Dermatol. Sci.*, 36(3):131–140, 2004.
- [87] M. I. Morasso and M. Tomic-Canic. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol. Cell*, 97(3):173–183, 2005.
- [88] J.M. Navarro, J. Casatorres, and J.L. Jorcano. Elements controlling the expression and induction of the skin hyperproliferation-associated keratin K6. *J. Biol. Chem.*, 270(36):21362–7, 1995.
- [89] M. Negi, T. Matsui, and H. Ogawa. Mechanism of human epidermal transglutaminase. *J. Invest. Dermatol.*, 77:389–392, 1981.
- [90] W. G. Nelson and T. T. Sun. The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J. Cell Biol.*, 97:244–251, 1983.
- [91] C. Niemann and F. M. Watt. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol.*, 12(4):185–192, 2002.
- [92] L. Norlen. Skin barrier formation: The membrane folding model. *J. Invest. Dermatol.*, 117:823–829, 2001.

- [93] L. Norlen, A. Al-Amoudi, and J. Dubochet. A cryotransmission electron microscopy study of skin barrier formation. *J. Invest. Dermatol.*, 120:555–560, 2003.
- [94] K. O’Hare, C. Benoist, and R. Breathnach. Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78(3):1527–1530, 1981.
- [95] C. S. Potten. Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *Int. Rev. Cytol.*, 69:271–318, 1981.
- [96] C. S. Potten and R. J. Morris. Epithelial stem cells in vivo. *J. Cell Sci. Suppl.*, 10:45–62, 1988.
- [97] R. Presland and R. Jurevic. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J. Dent. Educ.*, 66(4):564–574, 2002.
- [98] R. B. Presland, M. K. Kuechle, S. P. Lewis, Fleckman P., and B. A. Dale. Regulated expression of human filaggrin in keratinocytes results in cytoskeletal disruption, loss of cell-cell adhesion and cell cycle arrest. *Exp. Cell Res.*, 270:199–213, 2001.
- [99] V. Proft. Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung des tumorassoziierten Proteins TAP70. Master’s thesis, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Universität Karlsruhe, (TH), 2003.
- [100] X. S. Puente, L. M. Sánchez, C. M. Overall, and C. López-Otín. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.*, 4:544–558, 2003.
- [101] H.J. Rahmsdorf and P. Herrlich. Regulation of gene expression by tumor promoters. *Pharmacol. Ther.*, 48:157–188, 1990.
- [102] S. Rasheed, W. A. Nelson-Rees, E. M. Toth, P. Arnstein, and M.B. Gardner. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*, 33:1027–1033, 1974.

- [103] J. Rennecke et al. Protein-kinase-C $\mu$  expression correlates with enhanced keratinocyte proliferation in normal and neoplastic mouse epidermis and in cell culture. *Int. J. Cancer*, 80(1):8–103, 1999.
- [104] N. Resing, K. A. Al-Alawi, C. Blomquist, P. Fleckman, and B. A. Dale. Independent regulation of two cytoplasmic processing stages of the intermediate filament-associated protein filaggrin and role of Ca<sup>2+</sup> in the second stage. *J. Biol. Chem.*, 268:25139–25145, 1993.
- [105] V. Rhiemeier, U. Breitenbach, K.H. Richter, C. Gebhardt, I. Vogt, B. Hartenstein, G. Fürstenberger, C. Mauch, J. Hess, and P. Angel. A novel aspartic proteinase-like gene expressed in stratified epithelia and squamous cell carcinoma of the skin. *Am. J. Pathol.*, 168(4):1354–1364, April 2006.
- [106] A. Rossi et al. Effect of AP1 transcription factors on the regulation of transcription in normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 110(1):34–40, 1998.
- [107] J.A. Rothnagel, T. Mehrel, W.W. Idler, D.R. Roop, and P.M. Steinert. The gene for mouse epidermal filaggrin precursor. its partial characterization, expression, and sequence of a reacting filaggrin unit. *J. Biol. Chem.*, 262:15643–15648, 1987.
- [108] S. E. Rutberg, E. Saez, A. Glick, A. A. Dlugosz, B. M. Spiegelman, and S. H. Yuspa. Differentiation of mouse keratinocytes is accompanied by PKC-dependent changes in AP-1 proteins. *Oncogene*, 13:167–176, 1996.
- [109] E. Saez et al. *c-fos* is required for malignant progression of skin tumors. *Cell*, 82:721–732, 1995.
- [110] F. Sanger, S. Nicklen, and A.R. Coulson. Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74:5463–5467, 1977.
- [111] M. W. Sark, D. F. Fischer, E. deMeijer, P. van de Putte, and C. Backendorf. AP-1 and ets transcription factors regulate the expression of the human SPRR1A ke-

- ratinoocyte terminal differentiation marker. *J. Biol. Chem.*, 273(38):24638–24692, 1998.
- [112] J. Schlingemann, J. Hess, G. Wrobel, U. Breitenbach, C. Gebhardt, P. Steinlein, H. Kramer, G. Fürstenberger, M. Hahn, P. Angel, and P. Lichter. Profile of gene expression induced by the tumour promotor TPA in murine epithelial cells. *Int. J. Cancer*, 104(6):699–708, 2003.
- [113] T.E. Schneider, C. Barland, A.M. Alex, M.L. Mancianti, Y. Lu, J.E. Cleaver, H.J. Lawrence, and R. Ghadially. Measuring stem cell frequency in epidermis: a quantitative in vivo functional assay for long-term repopulating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:11412–11417, 2003.
- [114] M. Schorpp, R. Jäger, K. Schellander, J. Schenkel, E. F. Wagner, H. Weiher, and P. Angel. The human ubiquitin c promotor directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. *Nucleic Acids Res.*, 24(9):1787–1788, 1996.
- [115] M. Schorpp-Kistner, Wang Z. Q., P. Angel, and E. F. Wagner. JunB is essential for mammalian placentation. *Embo J.*, 18:934–948, 1999.
- [116] S. Seelmeier, H. Schmidt, V. Turk, and K. Von Der Helm. Human immunodeficiency virus has a aspartic-type protease that can be inhibited by pepstatin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:6612–6616, 1988.
- [117] M. Sibilio et al. The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell*, 102:211–220, 2000.
- [118] A.C. Steven and P.M. Steinert. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J. Cell Sci.*, 107:693–700, 1994.
- [119] L. Stryer. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 4. edition, 2003.
- [120] K. Suzukawa, T. J. Weber, and N. H. Colburn. AP-1, NF-kappa-B, and Erk activation thresholds for promotion of neoplastic transformation in the mouse epidermal JB6 model. *Environ. Health Perspect.*, 110(9):865–870, 2002.

- [121] A. Szabowski et al. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell*, 103(5):745–755, 2000.
- [122] D. J. Tobin, K. Foitzik, T. Reinheckel, L. Mecklenburg, V. A. Botchkarev, C. Peters, and R. Paus. The lysosomal protease cathepsin l is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *Am. J. Pathol.*, 160:1807–1821, 2002.
- [123] M. Tomic-Canic, M. Komine, M. Freedberg, I, and M. Blumenberg. Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, 17:167–181, 1998.
- [124] C. Toomes, J. James, A. J. Wood, et al. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nat. Genet.*, 23:421–424, 1999.
- [125] K. Turksen and T. Troy. Epidermal cell lineage. *Biochem. Cell Biol.*, 76:889–898, 1998.
- [126] M. Van de Craen, G. Van Loo, S. Pype, W. Van Crielinge, I. Van den brande, F. Molemans, W. Fiers, W. Declercq, and P. Vandenabeele. Identification of a new caspase homologue: caspase-14. *Cell Death Differ.*, 5:838–846, 1998.
- [127] R. van Doorn, N. A. Gruis, R. Willemze, P. A. van der Velden, and C. P. Tensen. Aberrant DNA methylation in cutaneous malignancies. *Semin. Oncol.*, 32(5):479–487, 2005.
- [128] O. Vettermann, G. Siegenthaler, H. Winter, and J. Schweizer. Retinoic acid signaling cascade in differentiating murine epidermal keratinocytes: alterations in papilloma- and carcinoma-derived cell lines. *Mol. Carcinog.*, 20:58–67, 1997.
- [129] B. Vogelstein and K.W. Kinzler. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.*, 9(4):138–141, 1993.

- [130] M. Wan, M. Takagi, B. N. Loh, X. Y. Xu, and T. Imanaka. Autoprocessing: an essential step for the activation of HIV-1 protease. *Biochem. J.*, 316:569–573, 1996.
- [131] I.B. Weinstein. Carcinogenesis as a multistage process—experimental evidence. *IARC scientific publications*, 39:9–25, 1982.
- [132] L. W. Weiss and A. S. Zelickson. Embryology of the epidermis: ultrastructural aspects. ii. period of differentiation in the mouse with mammalian comparison. *Acta Derm. Venereol.*, 55:321–329, 1975.
- [133] S. Wittlin, J. Rosel, F. Hofmann, and D. R. Stover. Mechanisms and kinetics of procathepsin d activation. *Eur. J. Biochem.*, 265:384–393, 1999.
- [134] A. Wlodawer, M. Miller, M. Jaskolski, B. K. Sathyanarayana, E. Baldwin, I. T. Weber, L. M. Selk, L. Clawson, J. Schneider, and S. B. Kent. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science*, 245:616–621, 1989.
- [135] J. Yokota. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3):497–503, 2000.
- [136] M. Young et al. Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(17):9827–9832, 1999.
- [137] S. H. Yuspa, M. Kulesz-Martin, T. Ben, and H. Hennings. Transformation of epidermal cells in culture. *J. Invest. Dermatol.*, 81:162s–168s, 1983.
- [138] S.H. Yuspa. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. *J. Dermatol. Sci.*, 17:1–7, 1998.
- [139] P.L. Zeeuwen. Epidermal differentiation: the role of proteases and their inhibitors. *Eur. J. Cell Biol.*, 83:761–773, 2004.

- [140] R. Zenz, R. Eferl, L. Kenner, L. Florin, L. Hummerich, D. Mehic, H. Scheuch, P. Angel, E. Tschachler, and E. F. Wagner. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature*, 437:369–375, 2005.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Ich habe an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt.

Stuttgart, den 14. August 2006

---

Verena Margrit Rhiemeier

## Teilpublikation

V. Rhiemeier, U. Breitenbach, K. H. Richter, C. Gebhardt, I. Vogt, B. Hartenstein, G. Fürstenberger, C. Mauch, J. Hess, P. Angel, A novel aspartic proteinase-like gene expressed in stratified epithelia and squamous cell carcinoma of the skin. (2006) *Am. J. Pathol.* 168(4):1354-1364